

# Untersuchungsmethoden für die chemokininduzierte Migration von Leukozyten

## Analysis methods for the chemokin-induced migration of leukocytes

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von Ina Rink, M.Sc. aus Jena

Tag der Einreichung: 08. März 2016, Tag der Prüfung: 02. Mai 2016

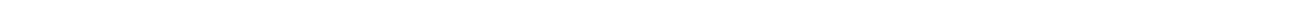
Darmstadt — D 17

1. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz
2. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar
3. Gutachten: Prof. Antal Rot, M.D.



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Clemens-Schöpf-Institut für organische  
Chemie und Biochemie  
Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz



---

Untersuchungsmethoden für die chemokininduzierte Migration von Leukozyten

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

eingereicht von

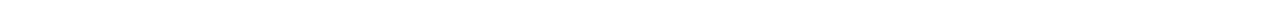
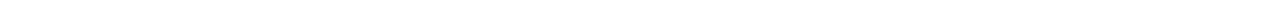
Ina Rink, M.Sc.  
aus Jena

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz  
1. Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar  
2. Korreferent: Prof. Antal Rot, M.D.  
Tag der Einreichung: 08. März 2016  
Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2016

Darmstadt 2016

**D17**

---





---

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von April 2013 bis März 2016 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. K. Schmitz durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder auf Tagungen vorgestellt:

#### Publikationen

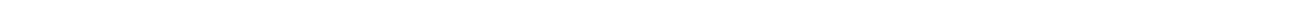
- M. Gírrbach<sup>1</sup>, I. Rink<sup>1</sup>, T. Ladnorg, C. Azucena, S. Heißler, T. Haraszti, U. Schepers, K. Schmitz, „Leukocyte responses to immobilized patterns of CXCL8“, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.004, in Druck.
- I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz, „A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients“, *The Journal of Immunology* **2015**, 194, 5549-5558.
- D. Helmer, I. Rink, J. A. R. Dalton, K. Brahm, M. Jöst, T. M. Nargang, W. Blum, P. Wadhwani, G. Brenner-Weiss, B. E. Rapp, J. Giraldo, K. Schmitz, „Rational design of a peptide capture agent for CXCL8 based on a model of the CXCL8: CXCR1 complex“, *RSC Advances* **2015**, 5, 25657-25668.

#### Eingeladene Veröffentlichungen

- I. Rink, K. Schmitz, „Wegweisende Oberflächen“, *Nachrichten aus der Chemie* **2015**, 63, 987-989.
- I. Rink, B. Elger, A. Erlenkötter, „Freund oder Feind? Genetische Ursachen von Morbus Crohn“, *GDCh, Aktuelle Wochenschau Biochemie* **2013**.

#### Posterbeiträge

- „A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients“, European Chemokine and Cell Migration Conference, Villars-sur-Ollon, Schweiz, **2015**.
  - „Structured immobilization of chemokines on surfaces“, Bioorthogonal Chemistry, Berlin, **2014**.
  - „Structured immobilization of chemokines on surfaces“, Chemical Biology, Heidelberg, **2014**.
-



---

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit durch fachliche und persönliche Unterstützung zur Seite standen.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Katja Schmitz für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, und für die Bereitstellung des interessanten Forschungsthemas ganz herzlich bedanken. Die Unterstützung, Ideen und kritischen Diskussionen haben einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Es war eine tolle und lehrreiche Zeit, in der ich sehr viel Freude hatte.

Herrn Prof. Harald Kolmar danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Dank auch an Dr. Claudia Muhle-Goll für die NMR-Messungen und Prof. Dr. Karen Bieback für die Bereitstellung vieler Zellkulturen. Ich danke Philipp Czechowski für die Messung der CD-Spektren und Sebastian Hörner, Heiko Fittler und Sascha Knauer für die LC-MS Messungen.

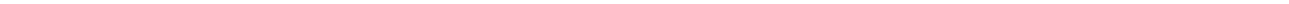
Auch möchte ich mich bei Dr. Suman Narayan und Asma Siddique aus dem AK Prof. Stark für die sehr effektive Kooperation auf dem Gebiet der Mikrofluidik bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Dorothea Helmer. Ich kann mir keine bessere Zusammenarbeit mit einer Kollegin vorstellen. Du hast mich immer unterstützt, mir Mut gemacht und an mich geglaubt. Ich danke dir für dein Vertrauen, deine vielen tollen Ideen und Anregungen sowie hilfreiche Kritik an der einen oder anderen Stelle, auch nachdem du Darmstadt verlassen hast.

Auch möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz für die tolle Zeit bedanken. Marina Jöst danke ich sehr für die schöne Zeit, die tollen Gespräche und die leckeren Kuchen, auch wenn die Welt nicht immer in Ordnung war. Kevin Brahm danke ich für seine HPLC-Läufe, aber auch für die schönen Spieleabende und andere lustige Aktivitäten. Julia Wack danke ich für die schöne Zusammenarbeit und die netten Gespräche. Anke Imrich danke ich für die vielen, aufmunternden und unterhaltsamen Gespräche sowie die Unterstützung in der Zellkultur und bei der Proteinexpression. Ein besonderer Dank geht auch an meine beiden Masterantinnen Victoria Engemann und Stefanie Eckes, die mich gerade am Ende meiner Arbeit und während des Umzuges sehr unterstützt haben. Auch möchte ich mich bei all den Praktikanten, Bachelor- und Masterabsolventen bedanken, die durch ihre Arbeit meine unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Peter. Auf eure grenzenlose Geduld, Unterstützung und den so wichtigen Halt konnte ich während meines ganzes Studiums bis hier immer zählen. Mutti, du bist einfach die Beste. Aber besonders möchte ich mich bei meinem Bruder Jan bedanken, der mir immer zur Seite stand. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

---



---

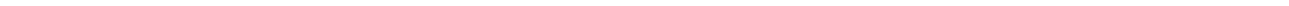
# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Chemokine	4
2.1.1 Eigenschaften von Chemokinen und ihren Rezeptoren	4
2.1.2 Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei Krankheiten	5
2.1.3 Das Chemokin Interleukin-8	6
2.1.4 Die Wechselwirkung von Chemokinen mit Glykosaminoglykanen	9
2.2 Chemotaxis	11
2.2.1 Extravasation von Leukozyten	11
2.2.2 Gerichtete Migration von Zellen	13
2.2.3 Chemotaxis von Endothelzellen	18
2.3 Stand der Technik	20
2.3.1 Aktinpolymerisationsassays	20
2.3.2 Chemotaxisassays	20
<b>3 Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
4.1 Allgemeine Materialien und Chemikalien	31
4.1.1 Häufig verwendete Puffer	31
4.1.2 Medien	32
4.1.3 Proteine, Proteinmarker und Antikörper	32
4.1.4 Primärzellen und Zelllinien	33
4.2 Geräte und Software	34
4.3 Proteinchemische Methoden	35
4.3.1 Proteinexpression und -reinigung	35
4.3.2 Proteinanalytik	37
4.3.3 Proteinkonjugation	39
4.4 Zellbiologische Methoden	40
4.4.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten	40
4.4.2 Allgemeine Kulturbedingungen	41
4.4.3 Kultivierung von Suspensionszellen	41
4.4.4 Kultivierung von adhärenenten Zellen	41

4.4.5	Bestimmung der Zelldichte . . . . .	42
4.5	Zellmigrationsassays . . . . .	43
4.5.1	Transwellassay mit Suspensionszellen . . . . .	43
4.5.2	Transwellassay mit adhärennten Zellen . . . . .	43
4.5.3	Statistische Auswertung der Transwellassays . . . . .	44
4.5.4	Agarosespotassay . . . . .	44
4.5.5	Haptotaxisassay . . . . .	45
4.6	Zellaktivitätsassays . . . . .	48
4.6.1	Klassischer Aktinpolymerisationsassay . . . . .	48
4.6.2	Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen . . . . .	49
4.7	Mikrofluidik . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
5.1	Charakterisierung von Chemokinen und chemokinresponsiven Zellen . . . . .	53
5.1.1	Herstellung und Charakterisierung des Chemokins Interleukin-8 und Derivaten	53
5.1.2	Chemotaktische Reaktionen von Endothel- und Epithelzellen auf Interleukin-8 .	59
5.2	Assays zur Charakterisierung von und <i>High-Throughput Screening</i> nach Chemokininhibitoren . . . . .	70
5.2.1	Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im Transwellassay . . . . .	70
5.2.2	NMR-Studien zur Aufklärung der Bindung eines IL-8 Inhibitorpeptids an IL-8 .	75
5.2.3	Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im klassischen Aktinpolymerisationsassay . . . . .	76
5.2.4	Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen . . . . .	78
5.3	Chemotaxis an Einzelzellen . . . . .	92
5.3.1	Mikrofluidische Kanäle zur Untersuchung von Chemotaxis . . . . .	92
5.3.2	Haptotaxisassay für Leukozyten basierend auf oberflächengebundenen Chemokingradienten . . . . .	99
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>123</b>
6.1	Charakterisierung von Chemokinen und Chemokin responsiven Zellen . . . . .	123
6.1.1	Charakterisierung des Chemokins Interleukin-8 und Derivaten . . . . .	123
6.1.2	Chemotaktische Reaktion von Endothel- und Epithelzellen auf IL-8 . . . . .	125
6.2	Assays zur Charakterisierung von und <i>High-Throughput Screening</i> nach Chemokininhibitoren . . . . .	128
6.2.1	Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im Transwellassay und im klassischen Aktinpolymerisationsassay . . . . .	128
6.2.2	NMR-Bindungsstudien mit IL8RPLoops . . . . .	129
6.2.3	Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen . . . . .	129
6.3	Chemotaxis an Einzelzellen . . . . .	133
6.3.1	Mikrofluidische Kanäle zur Untersuchung von Chemotaxis . . . . .	133

---

6.3.2	Haptotaxisassay für Leukozyten basierend auf oberflächengebundenen Chemo- kingradienten . . . . .	134
6.4	Fazit . . . . .	139
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
7	<b>Anhang</b>	<b>153</b>





---

# Abkürzungsverzeichnis

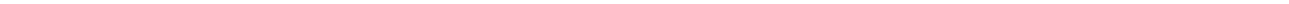
aa	Aminosäure
ADF	Aktindepolymerisationsfaktor
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AM	Acetoxymethylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CD	<i>Circular dichroism</i>
CPI	<i>Chemotactic Precision Index</i>
CV	<i>Column volume</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
ECFC	<i>Endothelial colony-forming cells</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FMI	<i>Forward Migration Index</i>
fMLP	<i>N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin</i>
GAG	Glykosaminoglykan
G-Aktin	Globuläres Aktin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

---

GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HAEC	<i>Human aortic endothelial cells</i>
HEK	<i>Human embryo kidney cells</i>
HHBS	<i>Hank 's Balanced Salt Solution</i>
HMEC	<i>Human microvascular endothelial cells</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
HUVEC	<i>Human umbelical vein endothelial cells</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IL	Interleukin
JAM	<i>Junctional adhesion molecules</i>
LAPAP	<i>Laser-assisted protein adsorption</i>
LCD	<i>Liquid crystal display</i>
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LTB4	Leukotrien B4
MAC1	<i>Macrophage antigen 1</i>
MCP	<i>Monocyte chemotactic protein</i>
$\mu$ CP	<i>Microcontact printing</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK	Negativkontrolle
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

---

PK	Positivkontrolle
PKB	Phosphokinase B
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
POC	<i>Point-of-care</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP	<i>Reversed phase</i>
SAM	<i>Self-assembled monolayers</i>
SDF	<i>Stromal derived factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMI	<i>Sideward Migration Index</i>
TCEP	Tis-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UV	Ultraviolett



---

# 1 Zusammenfassung

Die Chemotaxis von Immunzellen ist ein fundamentaler Prozess des Immunsystems, der u.a. durch kleine Signalproteine, sogenannte Chemokine, gesteuert wird. Trotz jahrzehntelanger Forschung auf diesem Gebiet sind noch lange nicht alle Zusammenhänge und Einflussfaktoren verstanden. Durch die regulierende Funktion der Chemokine spielen sie auch eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, Allergien, chronischen Entzündungen oder Krebs. Daher ist die Entwicklung von Inhibitoren für Chemokine von großer Bedeutung und es werden geeignete Testverfahren benötigt, um diese zu charakterisieren. Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung und Entwicklung solcher Assays zum *High-Throughput Screening* (HTS) von Chemokininhibitoren und deren Charakterisierung. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung von Einzelzellassays zur Untersuchung von Chemotaxis. Dazu wurde einerseits die Methode der Mikrofluidik etabliert und andererseits ein oberflächenbasierter Assays mit definierten, immobilisierten Gradienten entwickelt.

Bevor mit der Etablierung und Entwicklung der Assays begonnen werden konnte, wurde zunächst das rekombinant hergestellte Chemokin CXCL8, auch als Interleukin-8 (IL-8) bekannt, auf strukturelle und funktionelle Eigenschaften hin untersucht. Dabei konnten sowohl die korrekte Faltung als auch die chemotaktische Aktivität bestätigt werden. Die chemotaktische Aktivität von IL-8 Konjugaten wurde ebenfalls überprüft. Zur rekombinanten Herstellung einer  $^{15}\text{N}$ -markierten IL-8 Variante wurde die Expression optimiert. Als IL-8 responsives Zellsystem wurden primäre neutrophile Granulozyten aus Vollblut oder *Buffy Coats* verwendet, deren Isolierung und Handhabung wegen der schnellen Aktivierung der Zellen durch mechanische Einflüsse und donorabhängige Unterschiede schwierig ist. Daher wurde nach einem alternativen Zellsystem gesucht und es wurden HEK293-Zellen, die mit dem G-Protein gekoppelten IL-8 Rezeptor CXCR1 transfiziert worden waren, und zwei Endothelzelltypen im Transwellassay auf Migration nach IL-8 getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Zellen HEK293-CXCR1, im Gegensatz zu den Wildtyp HEK293, zwar prinzipiell in der Lage sind, nach IL-8 zu migrieren, jedoch war die Migration sehr schwach ausgeprägt und schlecht reproduzierbar. Ein Agarespotassay bestätigte die Chemotaxis der HEK293-CXCR1-Zellen in einem IL-8 Gradienten, jedoch konnten sie aufgrund ihrer schwachen chemotaktischen Reaktion nicht für weitere Migrationsassays verwendet werden. Anwendbar waren diese Zellen jedoch für die Entwicklung eines Aktinpolymerisationsassays in lebenden Zellen. Für die beiden Endothelzelltypen konnte keine IL-8 induzierte Migration nachgewiesen werden.

Zur Charakterisierung von Chemokininhibitoren wurde das Inhibitorpeptid IL8RPLoops auf die chemotaktische Wirkung von IL-8 im Transwellassay und im klassischen Aktinpolymerisationsassay untersucht. Dabei wurden die beiden Assays auf ihre Tauglichkeit getestet und bewertet. Der Transwellassay bietet prinzipiell eine einfache, aber kostspielige Möglichkeit zur Untersuchung von Inhibitoren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das System sehr störanfällig und somit nur schlecht reproduzierbar ist. Der klassische Aktinpolymerisationsassay wurde als nicht HTS-tauglich eingestuft, da einerseits die Durchführung sehr aufwendig und nicht mit vielen Parallelansätzen realisierbar ist.

---

Andererseits bewirkt die Handhabung eine schnelle Aktivierung der Neutrophilen auch ohne Chemoattraktant, wodurch mit diesem Assay keine zuverlässige Aussage möglich ist. Daher wurde ein Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen entwickelt, der einfacher durchzuführen ist und durch seine Anwendung in einer 96er Mikrotiterplatte die parallele Durchführung verschiedener Ansätze erlaubt. Es wurde ein Z'-Faktor von 0,5 für den Assay erhalten, womit dieser Assay auch hochdurchsatzfähig wäre. Es sind noch abschließende Versuche im HTS mit einer großen Anzahl bekannter und potenzieller Inhibitoren durchzuführen. Der Assay bietet nach den bisherigen Erkenntnissen eine gute Grundlage zum Screenen von Chemokininhibitoren auf die chemotaktische Wirkung von Zellen, da die Aktinpolymerisation die Chemotaxis der Zellen einleitet und somit als Vorstufe gesehen werden kann.

Zur Untersuchung der Chemotaxis an Einzelzellen wurde einerseits die weit verbreitete Technik der Mikrofluidik zur Herstellung löslicher Gradienten etabliert. Dabei konnten wichtige Aspekte wie die Länge des linearen Bereichs des Gradienten im Kanalquerschnitt, die Geometrie der Kanäle und der Konzentrationsgradient des verwendeten Chemoattraktanten herausgearbeitet werden. *In vivo* liegen Chemokine jedoch nicht nur in gelöster, sondern auch in immobilisierter Form vor. Auf Endothelzellen sind sogenannte Glykosaminoglykane lokalisiert, die Chemokine über spezifische Erkennungsregionen binden können und so für die Stabilisierung von Chemokingradienten in der Blutbahn und im Gewebe sorgen. In dieser Arbeit wurden durch Diffusion in Agarose kontinuierliche Proteingradienten erzeugt und auf eine Petrischalenoberfläche gestempelt. Diese IL-8 Gradienten erwiesen sich als geeignet, um gerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten auszulösen. Die Migration der einzelnen Neutrophilen wurde analysiert und es wurde ein neuer Index, der *Chemotactic Precision Index (CPI)*, eingeführt. Dieser erlaubt eine einfache und intuitive Bewertung der Präzision, mit welcher die Zellen entlang eines gegebenen Gradienten migrieren. Der Assay bietet die Grundlage zur weiteren Aufklärung der Haptotaxis von Zellen auf oberflächengebundenen Chemoattraktanten und weiteren Einflussfaktoren der Chemotaxis. Das System ist durch die Kombination von Mikrofluidik und immobilisierter Chemokingradienten noch erweiterbar und sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.

---

## 2 Einleitung

Die Migration von Leukozyten ist ein wichtiger Prozess in der Homöostase des Immunsystems sowie bei Entzündungsreaktionen. Es ist eine Vielzahl von Signal- und Adhäsionsproteinen an der Steuerung dieser Migration beteiligt, wodurch dieses System sehr komplex ist. Eine wichtige Klasse an Signalproteinen stellen die Chemokine, chemotaktische Zytokine, dar. Chemokine sind kleine, sekretorische Proteine, die die Migration von Immunzellen steuern. Dabei bilden sie einen Konzentrationsgradienten ausgehend vom Entzündungsherd aus, der den Zellen die Migrationsrichtung vorgibt. Handelt es sich um einen löslichen Gradienten, spricht man von Chemotaxis. Der Gradient kann jedoch auch in immobilisierter Form vorliegen, wenn z.B. die Chemokine auf der Zelloberfläche gebunden vorliegen. In diesem Fall wird der Prozess Haptotaxis genannt. Seit Jahrzehnten forschen Wissenschaftler auf diesem Gebiet, um die zugrunde liegenden Prozesse der Migration vollständig zu verstehen, dabei sind jedoch immer noch viele Fragen offen. Das tiefere Verständnis dieser Prozesse könnte durch neue Assays zur Untersuchung von Inhibitoren oder anderen Einflussfaktoren auf die Zellmigration maßgeblich vorangetrieben werden.

Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Chemokine werden in Kapitel 2.1 beschrieben. Durch ihre wichtige Rolle in der Regulierung des Immunsystems können Fehlfunktionen in Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten, Allergien und Krebs resultieren. Chemokine werden mit einer Vielzahl verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht, wodurch sie ein interessantes Zielmolekül für die Wirkstoffforschung darstellen. Wie bereits erwähnt, können Chemokine einen oberflächengebundenen Gradienten ausbilden. Dies geschieht über die Wechselwirkung mit den Glykosaminoglykanen auf Endothelzellen, die einen wichtigen Aspekt in der Regulierung der Zellmigration darstellt. Eines der am besten untersuchten Chemokine ist Interleukin-8 (IL-8). Es ist vor allem an Entzündungsreaktionen beteiligt und sorgt für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blutgefäß zum Ort der Entzündung.

Dieser Prozess wird als Extravasation bezeichnet und ist nicht nur auf neutrophile Granulozyten beschränkt, sondern gilt allgemein für Leukozyten. Kapitel 2.2 befasst sich mit der Migration von Zellen. Dabei wird die Extravasation detailliert dargestellt. Weiterhin wird der Mechanismus der Aktinpolymerisation behandelt, der die Zelle zur Migration befähigt. Die Aktinpolymerisation kann somit als Vorstufe der Chemotaxis gesehen werden. Chemokine spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei anderen Migrationsprozessen wie der Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße.

Um die Aktinpolymerisation und die Chemotaxis bzw. Haptotaxis *in vitro* untersuchen zu können, werden entsprechende Assays benötigt. Kapitel 2.3 gibt eine Übersicht über bestehende Assays, angefangen bei den klassischen Assays wie der Boyden- und Zigmond-Kammer. Mikrofluidische Netzwerke finden verstärkt Anwendung zur Gradientenerzeugung und so auch im Bereich von Zellmigration. Da die Migration von Leukozyten *in vivo* auch über einen oberflächengebundenen Gradienten erfolgt, sind Assays zur Untersuchung von Haptotaxis auch von großer Bedeutung.

---

## 2.1 Chemokine

---

### 2.1.1 Eigenschaften von Chemokinen und ihren Rezeptoren

---

Die Migration von Immunzellen ist essentiell für die Funktion und Entwicklung des Immunsystems sowie für entzündliche Prozesse. Dieses System wird unter anderem von einer Proteinfamilie, den sogenannten Chemokinen, kontrolliert.<sup>[1,2,3,4,5]</sup> Chemokine werden von einer Reihe von Zellen wie Blutzellen, Endothel- und Epithelzellen sowie Muskelzellen nach Stimulierung von Pathogenen oder proinflammatorischen Zytokinen sekretiert.<sup>[6,7,8,9]</sup> Sie sind kleine, sekretorische Proteine mit einer Größe von 8 bis 12 kDa. Unabhängig von Klasse oder Funktion weisen sie eine auffallend ähnliche Tertiärstruktur auf, wobei ihre Sequenzhomologie zwischen 20 und 90 % stark schwankt.<sup>[10]</sup> Die Tertiärstruktur besteht aus einem unstrukturierten N-Terminus, der in ein dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt übergeht und schließlich mit einer  $\alpha$ -Helix am C-Terminus endet. Die Struktur der Chemokine wird über ihre vier Cysteine stabilisiert, wobei das erste mit dem dritten und das zweite mit dem vierten Cystein eine Disulfidbrücke ausbildet. Ausnahmen von dieser Regel gibt es nur wenige.<sup>[11]</sup> Der Großteil der Chemokine weist einen basischen pI auf, was in einer positiven Nettoladung der Chemokine resultiert. Diese positive Ladung trägt zu einer Wechselwirkung der Chemokine mit negativ geladenen Molekülen wie Glykosaminoglykanen auf Zelloberflächen bei.<sup>[12]</sup>

Chemokine aktivieren Leukozyten und weitere Zelltypen wie Endothelzellen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Chemokinrezeptoren bestehen aus sieben Transmembranhelices, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind.<sup>[10,13,14]</sup> Sie weisen bei einer Länge von 340 - 370 Aminosäuren 25 - 80 % Aminosäuresequenzhomologie auf. Es gibt einige Eigenschaften, die in der Klasse der Chemokinrezeptoren häufiger gefunden werden, als in anderen Klassen. Dazu gehören ein azides N-terminales Segment, die Sequenz DRYLAIVHA (oder eine Variation) in der zweiten intrazellulären Schleife, eine kurze, basische dritte intrazelluläre Schleife und ein Cystein in jeder der vier extrazellulären Domänen, die zwei Disulfidbrücken ausbilden.<sup>[13,14]</sup> Die Bindung von Chemokinen findet über einen Zweischnittmechanismus statt.<sup>[15]</sup> Im ersten Schritt bindet das Chemokin durch hohe Affinität an den Rezeptor, ohne eine Aktivierung auszulösen. Dabei spielen vor allem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Chemokin und den negativ geladenen, extrazellulären Rezeptordomänen sowie dem N-Terminus des Rezeptors eine Rolle. Im zweiten Schritt wird die Rezeptoraktivierung durch die Bindung des N-Terminus des Chemokins induziert, die in vielen Fällen von der Wechselwirkung dieses mit Resten in den Transmembrandomänen des Rezeptors realisiert wird.<sup>[15]</sup> Dadurch werden Signalkaskaden ausgelöst, die zu den typischen Reaktionen der Leukozyten wie Migration oder Ausschüttung von reaktiver Sauerstoffspezies und Enzymen führen. Die wichtigsten biologischen Funktionen der Chemokine sind die Steuerung der Leukozytenwanderung sowie die Entwicklung und Kontrolle des Immunsystems und sie fungieren als Corezeptor für die Invasion von Pathogenen.<sup>[3,16,17]</sup> Spezifische Rollen der Chemokin-Rezeptor-Wechselwirkung in Hämatopoese, Angiogenese und Entwicklung wurden ebenfalls berichtet.<sup>[13]</sup>

Aktuell sind über 50 humane Chemokine und 20 Rezeptoren literaturbekannt.<sup>[18]</sup> Chemokine und ihre Rezeptoren sind abhängig von der Anzahl und Position der konservierten, N-terminalen Cysteine in vier Klassen eingeteilt: CXCL, CCL, CL und CX3CL. Dabei steht C für Cystein, X für eine beliebige



---

ge Aminosäure außer Cystein und L für Ligand. Die Namen der entsprechenden Rezeptoren tragen laut Nomenklatur ein R anstelle des L (z.B. CXCR1 für CXC-Rezeptor 1).<sup>[13]</sup> Weiterhin können CXC-Chemokine in ELR<sup>+</sup>- und ELR<sup>-</sup>-Chemokine eingeteilt werden, abhängig vom Vorhandensein des sogenannten „ELR“-Motivs. Dieses besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Leucin und Arginin und ist am N-Terminus lokalisiert. Beide Unterklassen unterscheiden sich funktionell in ihrer Wirkung auf die Bildung neuer Blutgefäße. Chemokine in der ELR<sup>+</sup>-Klasse wirken angiogenetisch, während das Fehlen des Motivs einen angiostatischen Effekt herbeiführt.<sup>[10,19]</sup>

Eine weitere Einteilung der Chemokine basiert auf funktionellen Kriterien. Inflammatorische Chemokine werden von zirkulierenden Leukozyten und anderen Zellen nur nach Aktivierung exprimiert, während homöostatische Chemokine konstitutiv exprimiert werden. Manche Chemokine sind beiden Gruppen zugehörig, abhängig vom biologischen Kontext oder pathologischen Status. Die Expression von induzierbaren Chemokinen wird u.a. durch inflammatorische Mediatoren wie Tumornekrosefaktoren, Interferon- $\gamma$ , mikrobiologische Stoffwechselprodukte oder Traumata ausgelöst. Diese Chemokine spielen eine Rolle im angeborenen und adaptiven Immunsystem als Antwort auf Infektionen, Gewebeschädigungen und andere physiologische Abnormalitäten. Homöostatische Chemokine kontrollieren den kontinuierlichen Grundzustand der Zellmigration, der für die Regulierung und Kontrolle des Immunsystems notwendig ist.<sup>[2,4,20]</sup>

---

### 2.1.2 Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei Krankheiten

---

Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen bei inflammatorischen und regulatorischen Prozessen wie der Leukozytenmobilisierung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, Zellaktivierung sowie Angiogenese eine wichtige Rolle. In dem sehr komplexen Netzwerk aus Chemokinen und Chemokinrezeptoren können kleine Veränderungen eine große Wirkung haben. Es ist daher naheliegend, dass diese wichtige Klasse an Proteinen an einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt ist.

Viele Autoimmunkrankheiten stehen in Zusammenhang mit einer starken Immunantwort auf ein spezielles, körpereigenes Antigen, wodurch verstärkt Leukozytenaktivierung und -akkumulation in dem Zielgewebe ausgelöst werden. Wegen der wichtigen Funktion der Chemokine in der Immunantwort kann eine Störung des Systems zu Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose<sup>[21,22]</sup>, rheumatoider Arthritis<sup>[21,22,23,24]</sup> oder *Lupus erythematoses*<sup>[21]</sup> beitragen. So wurde z.B. die Beteiligung der Chemokine MCP-1, MCP-2 und MCP-3 an der Entwicklung von MS Läsionen im zentralen Nervensystem nachgewiesen.<sup>[25]</sup>

Typ II Diabetes gilt ebenfalls als eine immunvermittelte Krankheit und auch hier wird Chemokinen eine entscheidende Rolle nachgesagt. Ihr Einfluss kann sich z.B. als Folge von oxidativem Stress, Fetteinlagerungen und Lipidtoxizität sowie Glukotoxizität zeigen.<sup>[26]</sup> Histopathologische Untersuchungen der Bauchspeicheldrüse von Patienten, die an Diabetes erkrankt waren, zeigten eine signifikante Erhöhung der Expressionslevel der Chemokine CCL5, CCL8, CCL22, CXCL9, CXCL10 und CX3CL1.<sup>[27]</sup> Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer<sup>[24,26,28]</sup> und Parkinson<sup>[24,26]</sup> spielen Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle, denn im Gehirn ist die vermehrte Expression von Chemokinen schädlich und führt dort zu dauerhaften Schädigungen.

---

Durch die chemokinvermittelte Invasion von Leukozyten aus der Blutbahn heraus in die Wand der Blutgefäße sind Chemokine weiterhin an sowohl vaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und Arterienverletzungen<sup>[21,29,30]</sup> sowie Bluthochdruck<sup>[21]</sup> als auch an kardiovaskulären Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung<sup>[26]</sup> beteiligt. Das komplexe Netzwerk von Chemokinen und seinen Rezeptoren ist auch in die Entwicklung von Krebs und dessen Metastasierung involviert.<sup>[21,23,26,31]</sup> Die Krebszellen selbst können Chemokine sowie Chemokinrezeptoren exprimieren und somit die Angiogenese und damit das Wachstum, Überleben und Migrieren des Tumors steuern.<sup>[26,31]</sup> Besonders ELR<sup>+</sup>-CXC-Chemokine scheinen bei Krebs eine Schlüsselrolle zu spielen, da sie bei besonders aggressiven Krebserkrankungen beobachtet werden.<sup>[26]</sup>

Eine abnormale Chemokinregulierung wurde auch in Entzündungsreaktionen und Allergien<sup>[24]</sup> wie Asthma<sup>[24]</sup>, Arthritis, Dickdarmentzündung und Schuppenflechte<sup>[21]</sup> festgestellt. Auch bei bakteriellen und viralen Infektionen (vor allem HIV und Mykobakterien) sowie bei der Abstoßung von Transplantaten konnte der Einfluss von Chemokinen nachgewiesen werden.<sup>[21]</sup>

Es existieren ebenfalls eine Reihe von Organkrankheiten, die mit Chemokinen in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören Lebererkrankungen wie die virale Hepatitis, Fettleber, alkoholische Lebererkrankung sowie Leberfibrose<sup>[32]</sup>, Nierenerkrankungen<sup>[33,34,35]</sup> und Lungenerkrankungen<sup>[36]</sup>. Weiterhin sind entzündliche Darmkrankheiten wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn durch chronische, selbstzerstörerische Entzündungen des Magen-Darm-Trakts charakterisiert.<sup>[24,37]</sup> Auch hier spielt die Einwanderung von Leukozyten gesteuert durch Chemokine eine Schlüsselrolle.

---

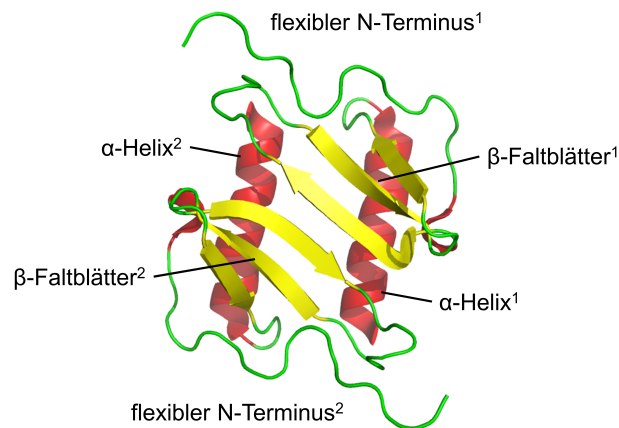
### 2.1.3 Das Chemokin Interleukin-8

---

Eines der am meisten untersuchten Chemokine ist CXCL8 oder Interleukin-8 (IL-8). Es wurde erstmals 1987 als Neutrophilen aktivierendes Protein beschrieben.<sup>[38]</sup> IL-8 kann durch nahezu jeden Zelltyp wie Leukozyten, Fibroblasten, Epithel- sowie Endothelzellen nach Aktivierung durch virale oder bakterielle Produkte sowie durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  exprimiert werden.<sup>[39]</sup> Die Expression findet als inaktive 99 Aminosäuren lange Vorstufe mit einer 20 Aminosäure langen Signalsequenz statt, die beim Export abgespalten wird. Es gibt verschiedene Isoformen von IL-8, wobei die 72 Aminosäuren Isoform die *in vivo* aktivste ist. Diese besitzt eine molare Masse von 8383 Da und weist einen basischen pI von 8,3 auf.<sup>[40]</sup> IL-8 ist stabil in einem weiten pH- und Temperaturbereich, aber kann leicht durch Reduktion der Disulfidbindungen inaktiviert werden.<sup>[40]</sup> Interleukin-8 ist ein ELR<sup>+</sup>-CXC-Chemokin mit der höchsten spezifischen Aktivität auf Neutrophile.<sup>[39]</sup>

Die Struktur von IL-8 ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Es besitzt wie alle Chemokine einen flexiblen N-Terminus, der über eine N-Schleife in ein dreisträngiges, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt übergeht, das über Schleifen verbunden ist. C-terminal befindet sich eine lange  $\alpha$ -Helix bestehend aus 16 Aminosäuren. Das erste Cystein (C7) bildet eine Disulfidbrücke zum dritten Cystein (C34) in der Schleife zwischen dem ersten und zweiten Strang des  $\beta$ -Faltblatts, während das zweite Cystein (C9) eine Disulfidbrücke zum vierten Cystein (C50) im dritten Strang des  $\beta$ -Faltblatts ausbildet.<sup>[41]</sup> IL-8 neigt, wie viele Chemokine, zur Dimerisierung durch die Wechselwirkung über Wasserstoffbrücken des jeweils ersten Strangs des  $\beta$ -Faltblatts miteinander und bildet so ein sechssträngiges  $\beta$ -Faltblattmotiv aus.<sup>[42]</sup> Für die Dimerisierungskonstante von IL-8 sind in der Literatur verschiedene Werte vom unte-

ren nanomolaren bis hin zum niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich zu finden.<sup>[43,44,45]</sup> Unter physiologischen Bedingungen liegt IL-8 im nanomolaren Bereich vor und ist somit als Monomer aktiv, wobei jedoch ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht zu beobachten ist.<sup>[43,45,46]</sup>

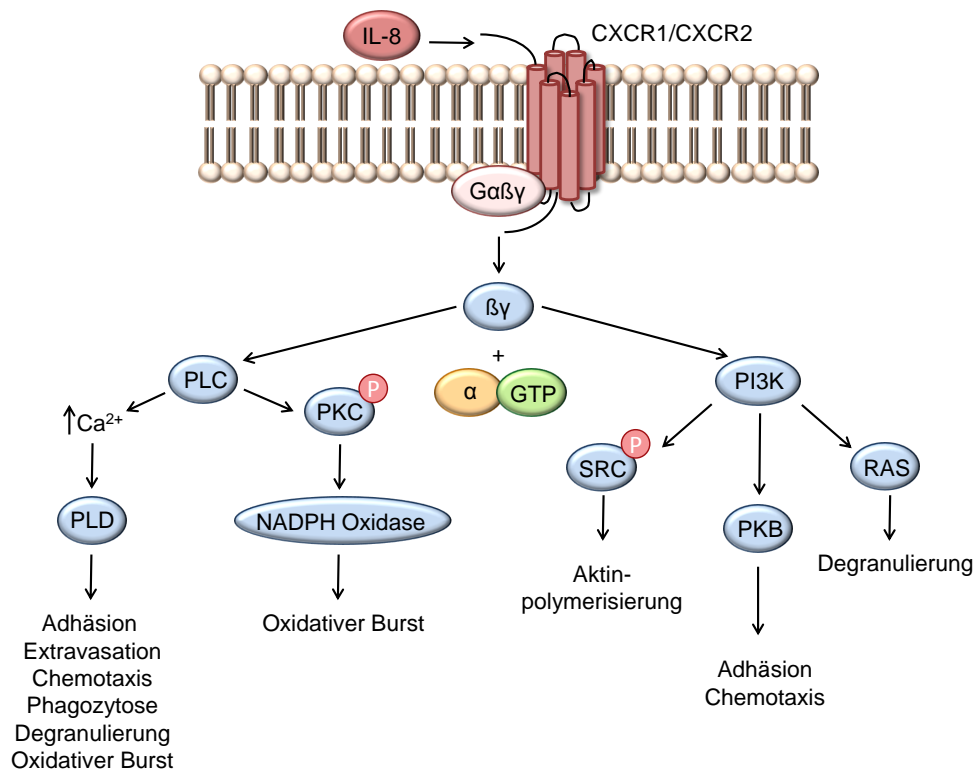


**Abbildung 2.1:** Struktur des IL-8 Dimers (PDB: 1IL8) basierend auf der NMR-Struktur<sup>[41]</sup>. Wichtige strukturelle Eigenschaften wie Schleifen (grün),  $\beta$ -Faltblätter (gelb) und  $\alpha$ -Helices (rot) sind markiert. Die hochgestellten Zahlen 1 und 2 stehen für jeweils ein Monomer.

IL-8 vermittelt seine Funktion über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2<sup>[47,48]</sup>, wodurch mehrere Signalkaskaden induziert werden.<sup>[49,50]</sup> Beide Rezeptoren weisen eine hohe Sequenzhomologie von 77 % auf.<sup>[47,48]</sup> Die Bindungsaffinität von IL-8 zu beiden Rezeptoren beträgt ungefähr 2 nM.<sup>[51]</sup> Diese Rezeptoren werden normalerweise auf Leukozyten und Endothelzellen gefunden.<sup>[52]</sup> Dabei zeigen neutrophile Granulozyten die höchsten Expressionslevel mit ähnlichem Verhältnis von CXCR1 zu CXCR2.<sup>[53]</sup> Weiterhin werden sie auf Krebszellen und mit Krebs in Verbindung gebrachten Stromazellen gefunden.<sup>[52]</sup> Die ELR<sup>+</sup>-Chemokine CXCL6-8 sind Liganden beider Rezeptoren, wohingegen CXCL1-3, CXCL5<sup>[4,10,31]</sup> sowie der Makrophagen Inhibitorfaktor (MIF)<sup>[54]</sup> zusätzliche Liganden für CXCR2 sind.

Durch die Bindung von IL-8 an seine beiden Rezeptoren werden eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert (Abbildung 2.2), wobei die Rezeptorinternalisierungsrate für CXCR2 größer ist und eine niedrigere Konzentration an IL-8 zur Aktivierung benötigt wird.<sup>[55,56,57]</sup> Weitere Unterschiede der beiden Rezeptoren sind die Beteiligung von CXCR1, nicht aber CXCR2, an der Aktivierung der Phospholipase D (PLD)<sup>[56,58]</sup> und an der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.<sup>[58,59]</sup> Daher wird vermutet, dass CXCR2 aufgrund seiner intrinsisch höheren Aktivität in der Rekrutierung der Neutrophilen in der frühen Zellantwort eine größere Rolle spielt, während CXCR1 direkt am Entzündungsort aktiv ist und dort zu den zytotoxischen Effekten wie der Freisetzung von Proteasen und ROS führt.<sup>[46]</sup>

Die Rezeptoren sind intrazellulär an einen heterotrimeren G-Protein-Komplex gekoppelt, der aus den Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  besteht. Durch Aktivierung des Rezeptors dissoziiert das an das inaktive  $G\alpha$  gebundene GDP und durch die Bindung eines GTPs wird die  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert. Durch Spaltung des GTPs durch eine GTPase wird sie wieder in ihre inaktive Form überführt.<sup>[61]</sup> Durch die dissoziierte  $\beta\gamma$ -Untereinheit werden die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Phospholipase C (PLC) aktiviert<sup>[60,61,63]</sup>, wodurch es über weitere Stufen zu den drei Haupteffekten in Neutrophilen kommt: Chemotaxis in Folge von Formänderung, Freisetzung reaktiver Sauer-



**Abbildung 2.2:** Vereinfachte Darstellung der IL-8 vermittelten Signaltransduktion über seine beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Die Bindung von IL-8 an den Rezeptor führt zur Dissoziation der membranverankerten  $G\alpha$ - und  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins. Durch Aktivierung des Rezeptors dissoziiert das an die inaktive  $G\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP, die durch die Bindung eines GTPs aktiviert wird. Die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit wechselwirkt mit Enzymen wie der Phospholipase C (PLC) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), wodurch es sowohl zur Freisetzung von Calciumionen und der damit verbundenen Aktivierung der Phospholipase D (PLD) als auch zur Aktivierung weiterer Enzyme wie den Proteinkinasen B (PKB) und C (PKC), der NADPH Oxidase sowie der zellulären Tyrosinkinase SRC kommt. Die Signalkaskade resultiert in zellulären Antworten wie Adhäsion und Extravasation, Aktinpolymerisation und Chemotaxis, Phagozytose, Degranulierung sowie oxidativer Burst. Abbildung modifiziert nach <sup>[60,61,62]</sup>.

stoffspezies und Exozytose.<sup>[40]</sup> Die Formänderung der Neutrophilen nach Zugabe von IL-8 unter Bildung von Lamellipodien zeigt die Aktivierung des kontraktile Systems an, das die Zellen befähigt, an Endothelzellen zu adhären und zu migrieren. Des Weiteren induziert IL-8 die Exozytose von sekretorischen Vesikeln und granulären Enzymen wie Gelatinase, Elastase und dem Vitamin B12-Bindeprotein, deren Aufgabe in der Abtötung von Pathogenen und dem Abbau von Gewebebarrieren liegt.<sup>[40,64]</sup> Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies verstärkt diese Effekte und dient ebenfalls der Bekämpfung von Pathogenen.<sup>[40,64,65]</sup> Die Remodulierung der Zellmembran während der Exozytose führt zur Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen wie Integrinen. Dadurch wird die Fähigkeit der Zellen, nach Aktivierung mit IL-8 an Endothelzellen oder der extrazellulären Matrix zu adhären, verstärkt.<sup>[40,64,65]</sup>

IL-8 ist auch an pathologischen Prozessen beteiligt. So identifiziert die Fähigkeit, Neutrophile langfristig zu aktivieren, Interleukin-8 als einen wichtigen Entzündungsmediator.<sup>[40]</sup> Es ist es an vielen chronischen Entzündungsreaktionen wie Rheuma<sup>[66,67]</sup>, chronischer Bronchitis<sup>[68]</sup>, multiple Sklero-

se<sup>[69]</sup> und Morbus Crohn<sup>[70]</sup> beteiligt. Auch bei der kardiovaskulären Erkrankung Arteriosklerose spielt IL-8 eine wichtige Rolle.<sup>[71]</sup> Es wird berichtet, dass IL-8 bei Krebserkrankungen hochreguliert ist und somit die Zellproliferation und -invasion, die Angiogenese sowie die Metastasierung erhöht.<sup>[72]</sup> IL-8 findet weiterhin breite Anwendung in der Medizin als Biomarker für Krankheiten wie chronischer Prostatitis, Harnblasenkrebs oder Lungeninfektionen.<sup>[73]</sup>

---

#### 2.1.4 Die Wechselwirkung von Chemokinen mit Glykosaminoglykanen

---

Um Immunzellen zu ihrem Wirkort zu dirigieren, muss ein stabiler Chemokingradient erzeugt werden. *In vivo* findet die Bildung des Gradienten durch Diffusion statt. Dieser kann durch Immobilisierung der Chemokine, die Glykosaminoglykanbindungsstellen aufweisen, über sogenannte Glykosaminoglykane (GAG) gebunden werden.<sup>[10,74]</sup> Entsprechende Bindesequenzen der Chemokine für GAGs sind XBBXBX und XBBBXXBX, wobei B für einen basischen Rest (normalerweise Lysin oder Arginin) steht. Ohne einen solchen Immobilisierungsmechanismus würde der Chemokingradient durch Diffusion schnell zerstört werden, insbesondere im Blutstrom.<sup>[75,76,77]</sup> Die Bindung von Chemokinen an oberflächengebundene und lösliche GAGs dient außerdem als eine Art Feinregulierung der Migration, Lokalisation und Aktivierung der Zellen.<sup>[78,79,80]</sup> Die Immobilisierung über GAGs erleichtert außerdem die Erkennung und Präsentation spezifischer Chemokine zu ihren Rezeptoren, um eine maximale Aktivität zu erhalten.<sup>[11]</sup> Dabei kann jedoch die Bindungsstelle der Chemokine zu den GAGs und ihren Rezeptoren überschneiden.<sup>[81]</sup>

Chemisch betrachtet sind GAGs anionische Polydisaccharide bestehend aus einer Uronsäure und einem Aminosucker (*N*-Acetylglucosamin oder *N*-Acetylgalactosamin), welche Bestandteil der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix sind.<sup>[82,83]</sup> Durch N- oder O-Sulfatierung weisen diese Strukturen eine starke Negativladung auf.<sup>[44,74]</sup> Heparin wird oft als Modell-GAG in Experimenten verwendet, da es im Vergleich zu anderen GAGs einfach und kostengünstig zu beziehen ist. Es hat eine ähnliche Struktur wie Heparansulfat, das am häufigsten vorkommende GAG, das auf nahezu allen Zellen im Körper zu finden ist.<sup>[74,84,85]</sup>

Aufgrund des hohen pI der meisten Chemokine scheint die Bindung an die negativ geladenen GAGs durch elektrostatische Wechselwirkungen begünstigt zu werden. Allerdings können die beiden Chemokine MIP-1 $\alpha$ /CCL3 und MIP-1 $\beta$ /CCL4, die einen pI von 4,48 besitzen und daher negativ geladen sind, ebenfalls an GAGs binden, weswegen eine spezifische Bindung vermutet wurde.<sup>[77]</sup> Die GAG-Bindungsstellen einiger Chemokine wurden bereits durch Mutagenesestudien untersucht. Zum Beispiel wurden für das Chemokin RANTES/CCL5 die Aminosäuren R44, K45 und R47 für die Bindung identifiziert, die als Hauptepitop angesehen werden.<sup>[86]</sup> Für MCP-1 konnten die Aminosäuren R18, K19, R24, K49, K58 und H66 als essentielle Reste nachgewiesen werden.<sup>[87,88]</sup> Im Fall von IL-8 sind Aminosäuren des  $\alpha$ -helikalen C-Terminus (R60, K64, K67, R68) sowie die N-Schleife (Aminosäuren 18-23), die ebenfalls an der Rezeptorinteraktion beteiligt ist, für die Bindung verantwortlich.<sup>[89]</sup> Es zeigen sich jedoch Unterschiede in den Affinitäten von Chemokinen zu verschiedenen GAGs.<sup>[90]</sup> Auch kann die Chemokin/GAG-Interaktion mehr Spezifität und Kontrolle in die Zellmigration bringen, indem eine selektive Bindung bestimmter Chemokine an verschiedenen GAGs eine Rolle spielt.<sup>[76,90,91]</sup> Nicht nur Chemokine, sondern auch viele andere Proteine, wie Proteasen, Lipid- und

---

Membranbindeproteine und weitere, interagieren mit GAGs. Die entsprechenden Bindesequenzen wurden in verschiedenen Proteinen, wie z.B. in den Apolipoproteinen B100 und E sowie Vitronectin, identifiziert.<sup>[74,92]</sup>

Durch die Chemokin/GAG-Bindung kann weiterhin die Oligomerisierung von Chemokinen induziert werden. Dies kann sowohl das Chemokin vor Proteolyse schützen<sup>[11,93]</sup> als auch die Spezifität der Chemokin/GAG-Bindung durch Unterschiede in der Bildung von Oligomeren oder durch die Art der oligomeren Strukturen, die gebildet werden, beeinflussen.<sup>[74]</sup>

---

## 2.2 Chemotaxis

---

Die Fähigkeit von Zellen oder Organismen, entlang eines chemischen Gradienten zu migrieren, wird seit über einem Jahrhundert untersucht. Dieser als Chemotaxis bezeichnete Prozess basiert auf Informationen über die räumliche Anordnung der Signalmoleküle, die durch Übertragung in mehrere zelluläre Prozesse schließlich in gerichteter Migration resultieren.<sup>[94]</sup> Chemotaxis kommt sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten wie Leukozyten, Endothelzellen, Samenzellen, neuronalen Wachstumskegeln sowie Fibroblasten und Thymozyten vor. Dabei liegen aufgrund der verschiedenen Größen zwischen Pro- und Eukaryonten unterschiedliche Mechanismen zugrunde. Leukozyten gehören zu den am meisten untersuchten eukaryontischen Zellen.<sup>[95]</sup> Bei der positiven Chemotaxis ist die Richtung der Migration von niedrigen zu höheren Konzentrationen an Lockstoff, z.B. im Fall der Leukozyten an Chemokin. Dieser Prozess ist fundamental für die Krebsmetastasierung, Embryogenese und Wundheilung. Dabei ist er abhängig von vielen Faktoren, wie intrazellulären Signalen und dem *cross talk* von Adhäsionsproteinen.<sup>[96]</sup>

---

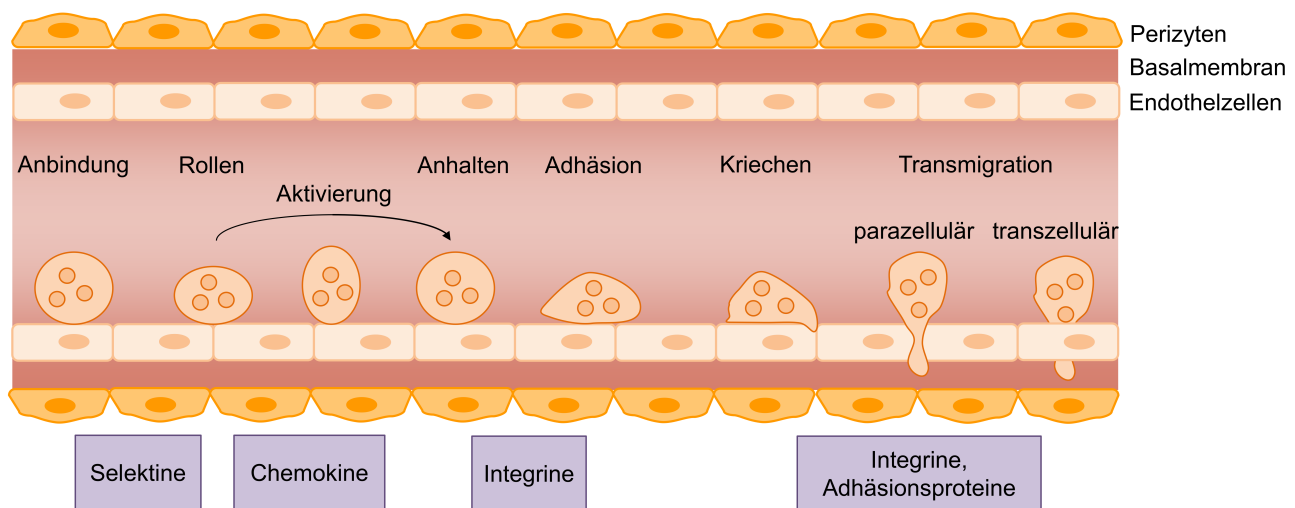
### 2.2.1 Extravasation von Leukozyten

---

Zirkulierende Leukozyten können unter konstitutiven und pathologischen Bedingungen extravasieren, d.h. vom Blutgefäß in das Gewebe wandern. Dies ist ein mehrstufiger Prozess, der durch die Aktivierung von Adhäsionsproteinen und deren Liganden sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen bestimmt wird.<sup>[97,98,99]</sup> Monozyten, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten migrieren alle nach dem gleichen Mechanismus, aber unterscheiden sich in ihrer Antwort auf chemotaktische und entzündliche Reize.<sup>[96,100]</sup>

Die Extravasation von Leukozyten wurde zunächst in drei Schritte eingeteilt: durch Selektine vermitteltes Rollen der Leukozyten auf der Endothelzellschicht gefolgt von Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine und schließlich ihr Anhalten auf den Endothelzellen vermittelt durch Integrine.<sup>[101]</sup> Inzwischen wurde dieser Mechanismus erweitert und es wird von einem mehrstufigen Prozess gesprochen: Anbindung, Rollen, Aktivierung, Adhäsion, Kriechen und Transmigration der Leukozyten (Abbildung 2.3).<sup>[96,101,102]</sup>

Die Adhäsion der Leukozyten wird durch Veränderung der Endothelzelloberfläche eingeleitet, die aus der Stimulierung durch inflammatorische Mediatoren (Histamine, Cysteinyl-Leukotriene und Zytokine) resultiert. Diese Mediatoren können durch im Gewebe ansässige Leukozyten sekretiert werden, wenn diese in Kontakt mit Pathogenen kommen.<sup>[101,102]</sup> Weiterhin können Endothelzellen direkt durch sogenannte *pattern-recognition receptors* (PRR) durch Detektion von Pathogenen stimuliert werden, was zur Hochregulierung der beiden Selektine Blutblättchen-Selektin (P-Selektin)<sup>[103]</sup> und Endothelzell-Selektin (E-Selektin)<sup>[104]</sup> auf den Endothelzellen führt.<sup>[102]</sup> Diese Selektine binden an ihre glykosylierten Liganden, wie z.B. den P-Selektin Glykoproteinliganden 1 (PSGL1)<sup>[105]</sup>, auf den Leukozyten, wodurch deren Adhäsion und ihre Rollbewegung entlang der Endothelzellschicht ausgelöst wird.<sup>[106]</sup> Ein weiteres Selektin, das Leukozyten-Selektin (L-Selektin)<sup>[104]</sup>, wird von den meisten Leukozyten exprimiert und ist ebenfalls am Prozess der Adhäsion und Rollbewegung beteiligt.<sup>[96,101]</sup>



**Abbildung 2.3:** Extravasation von Leukozyten. Der mehrstufige Prozess beginnt mit der Anbindung der Leukozyten aus der Blutbahn über Selektine, die sowohl auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten exprimiert werden. Anschließend folgt eine Rollbewegung der Leukozyten auf der Endothelzellschicht, bei der ebenfalls Selektine eine Rolle spielen. Die Aktivierung erfolgt durch Chemokine, die im Blut löslich vorliegen, aber auch auf der Endothelzellschicht über GAGs immobilisiert sein können. Ausgelöst von der Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Leukozyten findet eine Konformationsänderung der Integrine (z.B. LFA1, MAC1) statt, die die Adhäsion der Leukozyten begünstigt. Die Bindung der Integrine an ihre Liganden (z.B. ICAM1, ICAM2) auf der Endothelzelloberfläche führt zur Kriechbewegung der Leukozyten auf der Suche nach einer Transmigrationsstelle. In die Transmigration selbst sind Integrine und verschiedene Adhäsionsproteine wie CAMs, PECAM1, CD99, JAMs oder ECAM beteiligt. Abbildung modifiziert nach <sup>[101,102]</sup>.

Unter Scherstress, der im Blutstrom auf die Leukozyten wirkt, ist eine schnelle Bildung und Brechung der Bindung zwischen den Selektinen und deren Liganden für die Rollbewegung der Leukozyten notwendig. <sup>[107]</sup>

Diese Rollbewegung begünstigt den Kontakt der Zellen mit den chemokinpräsentierenden Endothelzellen zur Aktivierung der Leukozyten, die ein zweistufiger Prozess ist. Dieser kann durch proinflammatorische Zytokine, wie dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ausgelöst werden. <sup>[108,109,110]</sup> Auch der Kontakt von Leukozyten mit Endothelzellen, die als Antwort auf *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), Chemoattraktanten oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden, kann diese Aktivierung auslösen. <sup>[96,110]</sup> Chemokine liegen in gelöster Form im Blut vor, werden dabei aber auch über GAGs auf der Endothelzellschicht immobilisiert, wodurch das „Wegwaschen“ des Chemokingradienten durch das Blut verhindert wird. <sup>[75,76,77]</sup> Über die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren auf der Oberfläche der Leukozyten durch Chemokine wird die Konformation der Integrine verändert, sodass die Affinität zu ihren Liganden wie z.B. *immunoglobulin-like cell adhesion molecules* (ICAM) zunimmt. <sup>[102,111,112]</sup> Die wichtigsten Integrine für Leukozyten sind die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine wie das *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA1) oder das *macrophage antigen 1* (MAC1). <sup>[111,112]</sup> Klassische Chemoattraktanten, wie Formylpeptide, und Chemokine sind die physiologisch stärksten Aktivatoren für die integrinvermittelte Adhäsion. <sup>[101]</sup> Typische Liganden auf Endothelzellen für Integrine sind die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM1 und ICAM2, dabei ist die Bindung von LFA1 an ICAM1 essentiell für die feste Adhäsion der Leukozyten an die Endo-



---

thelzellen.<sup>[113]</sup> Die Bindung der Integrine an ihre Liganden aktiviert Signalkaskaden im Inneren der Leukozyten, wodurch die Adhäsion stabilisiert und die Zellmotilität initiiert wird.<sup>[101]</sup>

Die Adhäsion leitet den finalen Schritt der Extravasation, die Transmigration, ein, was jedoch nicht bedeutet, dass alle adhärenierten Zellen auch transmigrieren.<sup>[102]</sup> Dabei müssen die Zellen drei Barrieren überwinden: die Endothelzellschicht, die Basalmembran und die Perizyten.<sup>[101]</sup> In die Transmigration sind Integrine, CAMs (ICAM1, ICAM2 und *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM1)) sowie verschiedene Adhäsionsproteine wie *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM1), CD99, *junctional adhesion molecules* (JAMs) und *epithelial cell adhesion molecule* (ECAM) involviert.<sup>[96,101,114]</sup> Die Transmigration kann entweder parazellulär, also zwischen Endothelzellen, oder transzellulär, also durch eine Endothelzelle hindurch, stattfinden.<sup>[101,102,113]</sup> Bevor die Zellen durch die Blutgefäßwand hindurch migrieren, kriechen sie über die Wechselwirkung des von Endothelzellen exprimierten ICAM1 mit dem von Neutrophilen exprimierten MAC1 über die Wand des Blutgefäßes auf der Suche nach einer Transmigrationsstelle zur parazellulären Transmigration.<sup>[113]</sup> Können die Zellen „nicht zu einer solchen Stelle kriechen“, bevorzugen sie den transzellulären Weg durch die Endothelzellen hindurch.<sup>[113]</sup> Während der Transmigration erfolgt eine Reorganisation des Zytoskeletts der Endothelzellen und eine Neuordnung ihrer Verbindung zur extrazellulären Matrix (ECM).<sup>[115]</sup> Die Basalmembran besteht aus ECM Proteinen wie Kollagen und Laminin. Neutrophile können Proteasen wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Serinproteasen (z.B. Neutrophilelastase) freisetzen, die enzymatisch gegen die ECM wirken. Obwohl es naheliegend ist, dass sich die Neutrophilen durch die Membran hindurch „fressen“, konnte es bisher durch Inhibitionsversuche nicht nachgewiesen werden.<sup>[116,117]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Transmigration in Regionen der Basalmembran stattfindet, in denen niedrige Level an ECM (< 60 % im Vergleich zu hohen ECM-Anteilen) vorhanden sind.<sup>[118]</sup> Den Perizyten wird eine entscheidende Rolle bei der Transmigration zugesprochen, da sie in entzündetem Gewebe Lücken in naher Umgebung zur Basalmembran mit wenig ECM aufweisen, die einen Weg für die weitere Transmigration darstellen.<sup>[119]</sup> Weiterhin können Perizyten Chemokine sekretieren und somit zusätzlich die Chemotaxis von extravasierten Leukozyten zum Entzündungsort dirigieren.<sup>[120]</sup>

---

### 2.2.2 Gerichtete Migration von Zellen

---

Gerichtete Migration von Zellen spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Extravasation von Leukozyten als auch bei anderen Prozessen wie der embryonalen Entwicklung und der Bildung neuen Gewebes. Dabei kommt die Bewegung der Zellen durch einen Zyklus bestehend aus vier Schritten zustande: Protrusion der Vorderflanke, Adhäsion zum Untergrund, Retraktion des Zellendes und Ablösung vom Untergrund. Es ist ein weitestgehend autonomer Prozess der Zelle und wird durch das Lamellum vermittelt.<sup>[121]</sup>

Eine eukaryontische Zelle erkennt einen externen Konzentrationsgradienten über seine Zelllänge und übersetzt diesen in einen internen Signalgradient. Dieser sorgt für die morphologische Polarisierung der Zelle und die Zelle initiiert die direkte Migration über die Umstrukturierung des Zytoskeletts. Leukozyten in einem einheitlich verteilten Chemoattraktanten zeigen eine morphologische Polarisierung mit einer Vorderflanke und einem Uropod und es kommt zur Chemokinese der Zellen. In einem

---

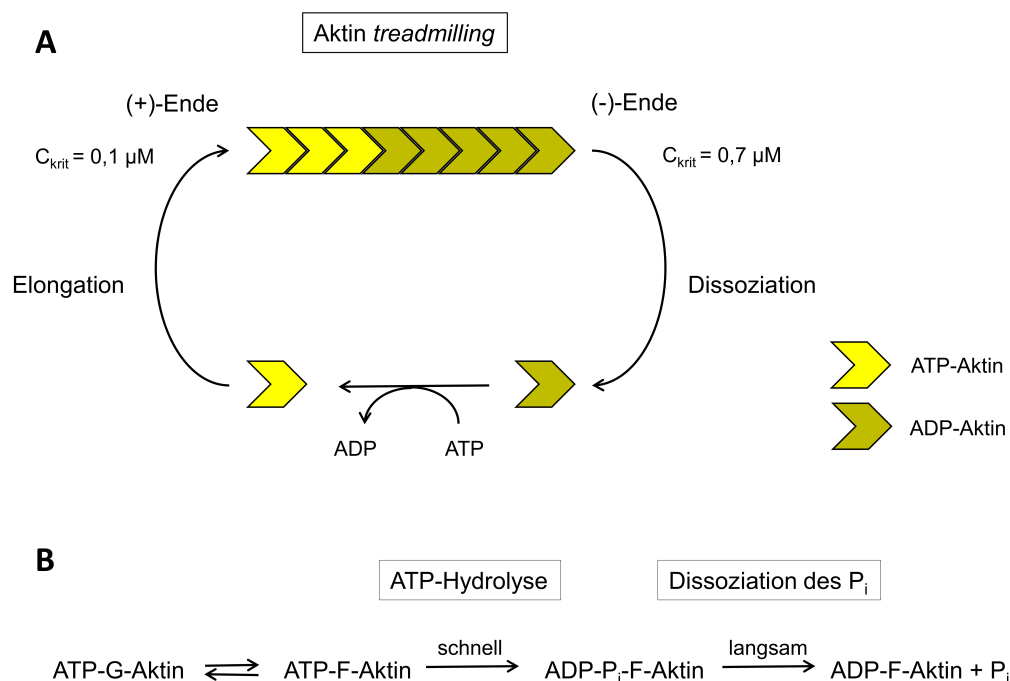
Konzentrationsgradienten wird die Vorderflanke zu den höheren Konzentrationen ausgerichtet und Chemotaxis findet statt. Die Orientierung der Zelle im Gradienten hängt dabei von der Steigung des Gradienten und der Konzentration an Chemoattraktant ab. Dabei können sich die Zellen in steileren Gradienten effektiver orientieren und die Konzentration sollte nicht zu hoch sein, da sonst die zelluläre Motilität inhibiert wird.<sup>[122]</sup> In optimalen Gradienten können z.B. Neutrophile 1 % Unterschied in der Konzentration über ihre Zelllänge von etwa 10  $\mu\text{m}$  wahrnehmen.<sup>[94,123]</sup> Die Zellen weisen auch eine Polarität in der Sensitivität auf den Chemoattraktant auf, wobei diese in der Vorderflanke erhöht ist. Über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die sowohl auf unstimulierten als auch auf polarisierten Zellen einheitlich über die Zelle verteilt sind, wird der externe Gradient intern amplifiziert. Dabei findet die Rezeptoraktivierung proportional zur externen Konzentration statt und an der Vorderflanke mit höheren Chemoattraktantkonzentrationen ist die Aktivierung höher als am Uropod. So wird der externe Gradient auf die Zelle übertragen und das Signal wird an die Zelle weitergegeben, wo es über Signalkaskaden amplifiziert wird. Durch die Aktivierung kommt es über die PI3-Kinase zur PIP3-Akkumulation an der Vorderflanke der Zelle, wodurch ein ungefähr sechsfach steilerer Gradient im Vergleich zum externen Gradienten in der Zelle entsteht. Es kommt weiterhin zur Aktivierung der Rho GTPasen Rac und RhoA. Dabei ist Rac für die Signale an der Vorderflanke verantwortlich, also für die Aktinpolymerisation und die Formation von Pseudopods. RhoA wird über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus in den Uropod segregiert und sorgt dort für die für die Akkumulation von Myosin II, wodurch die Myosin II vermittelte Kontraktion verstärkt wird, und die Formation des Uropods sorgt. Das Rac-Signal in der Vorderflanke inhibiert das RhoA-Signal, wodurch dieses auf den Uropod beschränkt ist. So wird die Polarität der beiden Rho GTPasen in der Zelle gesteuert.<sup>[122]</sup>

Die Zellmigration hängt von der Umstrukturierung des Zytoskeletts und somit von der Polymerisation und Depolymerisation von Aktin ab. Aktin ist eines der am meisten vorkommenden Proteine in Eukaryontenzellen. Es existieren drei Isoformen von Aktin: die  $\alpha$ -Isoform für die Skelett-, Herz- und glatte Muskulatur sowie die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform in Nichtmuskel- und Muskelzellen. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich aber nur geringfügig in einigen Aminosäuren.<sup>[124]</sup> Die Tertiärstruktur von Aktin besteht aus vier Domänen, die in zwei Hauptdomänen unterteilt werden können. Dabei sind die beiden Hauptdomänen propellerartig um ca. 20° gegeneinander verdreht.<sup>[125]</sup> Aktin kann in der Zelle als globuläres, monomeres Aktin (G-Aktin) oder als filamentöses, polymerisiertes Aktin (F-Aktin) vorliegen, je nachdem in welchem Zustand sich die Zelle befindet. G-Aktin besitzt eine Nukleotidbindungsstelle für Adenosintriphosphat (ATP) oder Adenosindiphosphat (ADP) sowie eine hoch affine Bindungsstelle für ein bivalentes Kation, in welcher meist  $\text{Mg}^{2+}$  gebunden ist. Zusammen bilden die Nukleotid- und die Kationenbindungsstelle eine ATPase-Einheit, wobei G-Aktin im Vergleich zu F-Aktin eine geringere ATPase-Aktivität aufweist.<sup>[126]</sup> F-Aktin wird dabei durch die Assoziation zweier G-Aktinmoleküle, die relativ zueinander verdreht sind, gebildet.<sup>[125,127]</sup>

Die zelluläre Bewegung wird durch Motorproteine wie Myosin (Nichtmuskelmyosin II) unterstützt, die an die Aktinfilamente binden und sich entlang der Filamente bewegen. Diese Bewegung von Myosin basiert auf der Konformationsänderung des Aktin-bindenden Kopfs, welche die Hydrolyse von ATP zu ADP benötigt. Somit liefert die ATPase-Aktivität des Myosins die Triebkraft für die Bewegung.<sup>[128]</sup> Elektronenmikroskopische Aufnahmen von F-Aktin zeigen ein Pfeilspitzenmuster, das durch die Bin-

dung mit Myosin entsteht. Die Filamente weisen somit eine Polarität auf, aufgrund derer das eine Ende als *barbed end* oder (+)-Ende und das andere als *pointed end* oder (-)-Ende bezeichnet wird.<sup>[129]</sup>

Die Anlagerung eines G-Aktins an das (+)-Ende eines Aktinfilamentes wird als Elongation bezeichnet, somit ist die Wachstumsrichtung des Filaments vom (+)- zum (-)-Ende (Abbildung 2.4A). Der Quotient aus Assoziations- und Dissoziationskonstante von ATP-G-Aktin an einem Ende eines Aktinfilamentes gibt die sogenannte kritische Konzentration an. ATP-G-Aktin oberhalb der kritischen Konzentration lagert sich an das Aktinfilament an. Unterhalb dieser Konzentration beginnt die Depolymerisation des F-Aktins und ADP-G-Aktin wird frei. Die kritische Konzentration am (+)-Ende ist mit  $0,1\ \mu\text{M}$  geringer als die des (-)-Endes mit  $0,7\ \mu\text{M}$ . Infolgedessen ist die stationäre Konzentration an G-Aktin am (+)-Ende oberhalb der kritischen Konzentration, wodurch es zur Anlagerung der G-Aktinmoleküle kommt, und unterhalb dieser am (-)-Ende, wodurch dort eine Depolymerisation stattfindet.<sup>[121]</sup> Die Aktinpolymerisation ist diffusionsabhängig, somit bestimmt die Kollisionsrate von G-Aktin mit F-Aktin am (+)-Ende des Filaments die Reaktionsgeschwindigkeit. Dabei spielt auch die Orientierung der Moleküle zueinander eine große Rolle, denn nur 2 % der Zusammenstöße führen zu einer Bindung.<sup>[130]</sup>



**Abbildung 2.4:** A) Aktin *treadmilling*. Bei der Elongation assoziiert ein ATP-G-Aktin an das (+)-Ende des Aktinfilaments. Die kritische Konzentration am (+)-Ende beträgt  $0,1\ \mu\text{M}$ . Im Aktinfilament wird das ATP zu ADP hydrolysiert und es dissoziiert ADP-G-Aktin am (-)-Ende des Filaments. Dort liegt die kritische Konzentration bei  $0,7\ \mu\text{M}$ . Nach dem Austausch von ADP zu ATP kann eine erneute Elongation am (+)-Ende stattfinden. B) Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation des ATP-G-Aktin am (+)-Ende des F-Aktins. Ist ATP-F-Aktin gebildet, findet eine Hydrolyse des ATP statt. Diese ist im Vergleich zur Dissoziation des  $\gamma$ -Phosphats sehr schnell. Abbildung modifiziert nach<sup>[131,132]</sup>.

Bei der Elongation findet eine Konformationsänderung des angelagerten Monomers statt. Dadurch wird die ATPase-Aktivität gesteigert, die die Hydrolyse des ATP- $\gamma$ -Phosphats beschleunigt.<sup>[125]</sup> Die Hydrolyse von ATP ist irreversibel<sup>[133]</sup> und im Vergleich zur Dissoziation des P<sub>i</sub> schnell (Abbildung

---

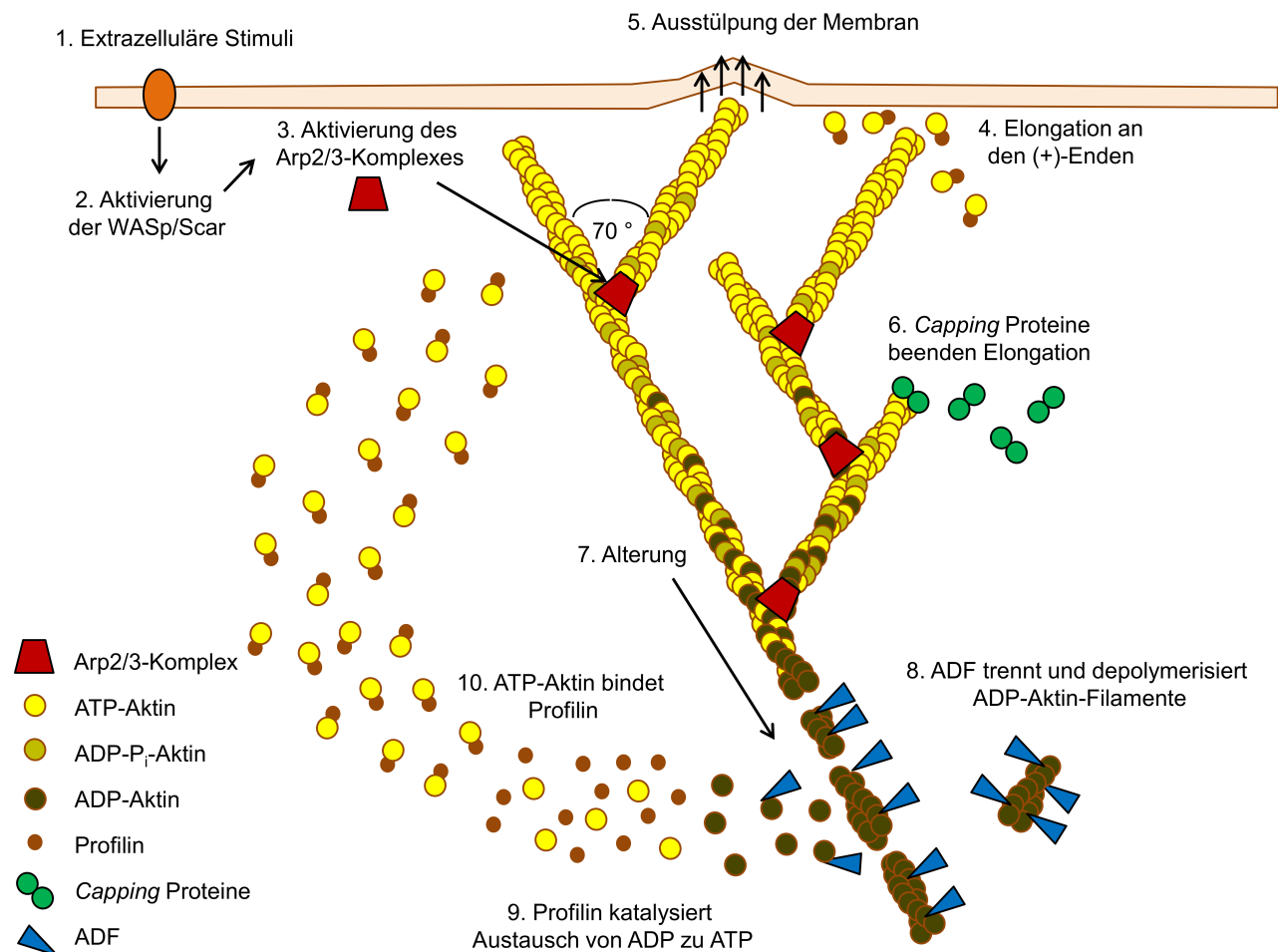
2.4B). So liegt die Halbwertszeit von ATP in F-Aktin etwa bei zwei Sekunden<sup>[134]</sup>, während die des ADP-P<sub>i</sub> deutlich höher bei etwa 350 s<sup>[121,135]</sup> liegt. Anhand dessen kann das Alter der Aktinfilamente abgeschätzt werden.<sup>[121]</sup>

ADP-P<sub>i</sub>-Aktin und ATP-G-Aktin weisen die gleichen Eigenschaften auf. Somit zeigt ADP-P<sub>i</sub>-Aktin ebenfalls eine hohe Affinität zum (+)-Ende des F-Aktins. Ist jedoch das Phosphat dissoziiert, ist die Dissoziation des ADP-Aktins vom (+)-Ende schneller. Die Dissoziation von ATP- und ADP-Aktin vom (-)-Ende ist jedoch langsam.<sup>[136]</sup> Somit herrscht im stationären Zustand ein Gleichgewicht, auch *treadmilling* genannt, bei dem ATP-Aktin am (+)-Ende assoziiert und ADP-Aktin am (-)-Ende dissoziiert (Abbildung 2.4). Daraus folgt, dass die Polymerisationsrate abhängig von der Menge an verfügbarem ATP-G-Aktin in der Zelle sowie der Verfügbarkeit von (+)-Enden zur Polymerisation ist.<sup>[121]</sup> *Treadmilling* und somit die Assoziation und Dissoziation von Aktin ist ein langsamer Prozess. *In vivo* hingegen ist dieser Prozess deutlich schneller, da viele Faktoren in das Gleichgewicht eingreifen.<sup>[131]</sup>

Die Zelle benötigt eine ausreichende Reserve an monomerem G-Aktin, damit nach Aktivierung die Aktinpolymerisation stattfinden kann. Dies kann zum einen durch die beiden Proteine Profilin<sup>[137,138]</sup> oder Thymosin-β4<sup>[139]</sup> realisiert werden. Profilin bindet monomeres G-Aktin am *barbed end*, wodurch weiterhin eine Elongation an das (+)-Ende jedoch nicht an das (-)-Ende eines Filaments stattfinden kann. Es inhibiert ebenfalls die spontane Nukleation der Aktinfilamente und katalysiert den Nukleotidaustausch von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin. Thymosin-β4 hingegen blockiert alle Aktinreaktionen inklusive Nukleation und Wachstum an beiden Enden. Durch die Konkurrenz zwischen Profilin und Thymosin-β4 kann jedoch diese komplette Blockierung aufgehoben werden, da Profilin Aktin fester bindet und so das G-Aktin zur Polymerisation bereitstellt, während durch Thymosin-β4 die Reserve in der Zelle gehalten wird. Durch sogenannte *capping* Proteine werden außerdem die (+)-Enden der Filamente gebunden und eine Polymerisation verhindert.<sup>[121,132]</sup>

Zum anderen ist es wichtig, diese Reserve an G-Aktin aufzufüllen. Dazu muss die Depolymerisation am (-)-Ende katalysiert werden, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Dissoziation des Phosphats ist. Der Aktindepolymerisationsfaktor (ADF, auch Cofilin genannt) beschleunigt diese Dissoziation und erhöht somit die kritische Konzentration am (-)-Ende.<sup>[140]</sup> Außerdem kann ADF Aktinfilamente trennen und so neue (+)-Enden für die Polymerisation bilden.<sup>[121]</sup>

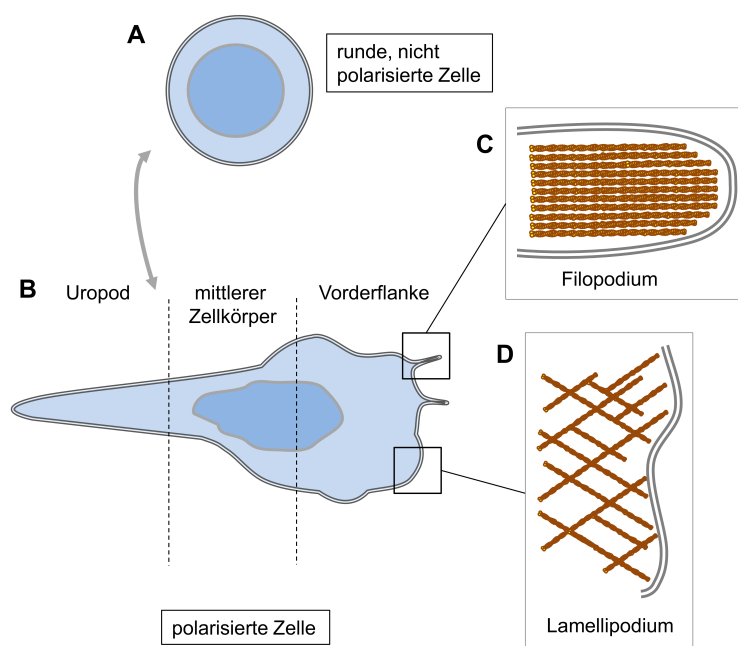
Die Aktinpolymerisation kann durch drei verschiedene Mechanismen initiiert werden. Die *de novo* Nukleation und die damit verbundene Bildung neuer Aktinfilamente stellt einen Mechanismus dar. Durch das „*uncapping*“ bereits vorhandener Aktinfilamente kann ebenfalls die Initiierung erfolgen. Der dritte Mechanismus beruht auf der Trennung bestehender Filamente durch z.B. ADF.<sup>[121,141]</sup> Die *de novo* Nukleation wird durch den Arp2/3-Komplex katalysiert, indem er an bereits vorhandenes F-Aktin bindet und ausgehend davon ein neues Filament bildet, an das sich weiteres G-Aktin anlagern kann. Dadurch entsteht eine Verzweigung der Filamente in einem Winkel von 70°. <sup>[142]</sup> Induziert wird der Arp2/3-Komplex durch Proteine der WASp/Scar Familie, die durch extrazelluläre Stimuli wie Chemoattraktanten aktiviert werden (Abbildung 2.5).<sup>[121,141]</sup>



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung des Zyklus der *de novo* Aktinpolymerisation. 1) Die Zelle wird über Rezeptoren durch extrazelluläre Stimuli wie Chemoattraktanten aktiviert. 2) Über die induzierte Signaltransduktion kommt es u.a. zur Aktivierung der Proteinfamilie WASp/Scar. 3) Diese wiederum aktivieren den Arp2/3-Komplex, der die Entstehung neuer Zweige an den (+)-Enden bestehender F-Aktin-Filamente katalysiert. 4) Elongation von ATP-G-Aktin und schnelles Wachstum der neuen Filamente, wodurch 5) die Zellmembran ausgestülpt wird. 6) *Capping* Proteine beenden die Elongation durch Bindung an die (+)-Enden der Filamente. 7) Durch die Hydrolyse von ATP und die Dissoziation von  $\gamma$ -Phosphat fangen die Filamente an zu altern. 8) ADF (Aktindepolymerisationsfaktor) beschleunigt die Dissoziation des Phosphats sowie die Dissoziation der ADP-Aktinmoleküle am (-)-Ende der Filamente und trennt ADP-Aktinfilamente ab. 9) Profilin katalysiert den Austausch von ADP zu ATP des dissoziierten G-Aktins. 10) ATP-Aktin bindet Profilin und steht für eine neue Elongation zur Verfügung. Abbildung modifiziert nach <sup>[121,141]</sup>.

Leukozyten und viele andere Zelltypen nutzen einen amöboiden Migrationsmechanismus. Dazu brauchen sie eine räumliche Asymmetrie, die es ihnen ermöglicht, intrazelluläre Kräfte vom Lamellum auf den gesamten Zellkörper zu übertragen. Durch eine polarisierte Morphologie ist die Zelle in der Lage, diese Kräfte zu übertragen (Abbildung 2.6B).<sup>[143]</sup> Die Vorderflanke der Zelle ist durch Lamellipodien gekennzeichnet, in denen fingerartige, nach außen gestülpte Aktinfilamente lokalisiert sind, die ständig in Bewegung sind.<sup>[144]</sup> Der Nukleus und andere Zellorganellen befinden sich in der Mitte der Zelle, dem Zellkörper. Am hinteren Teil der Zelle bildet sich ein 2 - 10  $\mu\text{m}$  langer Schwanz, der als Uropod bezeichnet wird.<sup>[145]</sup> Im äußeren Rand des Lamellipodiums findet vermehrt Aktinpolymerisation statt, die sich an dieser Stelle durch schnelles *treadmilling* unterstützt durch regulatorische

Proteine wie ADF, Profilin und *capping* Proteine auszeichnet (Abbildung 2.6D). Während der Migration werden fingerartige Ausstülpungen, sogenannte Filopodien, hervorgebracht, die für das Abtasten der Umgebung verantwortlich sind (Abbildung 2.6C). Sie enthalten ebenfalls Aktin, aber keine verzweigten, sondern gebündelte Aktinfilamente.<sup>[141]</sup> Der Polarisation folgt die Protrusion, das Ausdehnen der Vorderflanke. Durch die Polymerisation der Aktinfilamente wird die Membran vorwärts gedrückt, wodurch sogenannte Pseudopodien entstehen.<sup>[145,146]</sup> Die Kraft des F-Aktins auf den vorderen Teil der Zelle führt ebenfalls zu einem rückwärtigen Stoß der Filamente gegen den Uropod.<sup>[143]</sup> Durch fokale Adhäsion zwischen der Zelle und dem Untergrund, z.B. durch die Wechselwirkung der Aktinfilamente mit Integrinen, sind Punkte für den Krafttransfer vorhanden, die eine schnellere Migration ermöglichen.<sup>[147,148]</sup> Myosin kontrahiert das filamentöse Netzwerk im Lamellipodium und mit der Retraktion des Uropods bewegt sich die Zelle vorwärts.<sup>[143,148]</sup>



**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle. A) Runde, sich frei bewegende Zelle, die keine Polarisation aufweist. B) Durch Aktivierung der Rezeptoren kommt es zur Polarisation der Zelle. Die Vorderflanke besteht aus Lamellipodien und Filopodien. In der Mitte der Zelle befindet sich der Nukleus und Zellorganellen. Eine schwanzartige Verlängerung, der sogenannte Uropod, zeigt das Ende der Zelle an. C) Aktinbündel in Filopodien. D) Verzweigte Aktinfilamente im Lamellipodium. Abbildung modifiziert nach<sup>[141,144,145]</sup>.

### 2.2.3 Chemotaxis von Endothelzellen

Chemotaxis spielt nicht nur bei der Extravasation von Leukozyten eine Rolle, sondern auch bei anderen Prozessen wie der Regulierung der Angiogenese, der embryonalen Entwicklung aber auch der Bildung von Krebs. Angiogenese, die Bildung sowie das Wachstum von Blutgefäßen findet sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen statt.<sup>[149,150,151]</sup> Chemokine können einen angiostatischen oder angiogenetischen Effekt haben und sind so an der Regulierung der Angiogenese maßgeblich beteiligt. Wie bereits in Kapitel 2.1.1 erläutert, spielt das ELR-Motiv eine

---

wichtige Rolle: ELR<sup>+</sup>-CXC-Chemokine fördern die Angiogenese, während ELR<sup>-</sup>-CXC-Chemokine sie inhibieren.<sup>[19]</sup> Die Chemokine CXCL1-3 und 5-8 sind angiogenetische Chemokine. CXCL4, 9-11 und 14 haben einen angiostatischen Effekt.<sup>[149,150,151]</sup>

Die angiogenetischen Eigenschaften von IL-8 wurden in den frühen 90er Jahren entdeckt. Interleukin-8 konnte eine chemotaktische Reaktion in menschlichen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC)<sup>[152]</sup> und Aorta (HAEC)<sup>[153]</sup> auslösen. IL-8 fördert die Angiogenese auf vier Wegen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass IL-8 sowohl die Proliferation von Endothelzellen als auch die Kapillarenbildung *in vitro* stimuliert.<sup>[154,155]</sup> Zum anderen ist IL-8 in der Lage, die Apoptose von Endothelzellen zu inhibieren und die Expressionslevel von Matrixmetalloproteasen (MMP) zu erhöhen, die für die proteolytische Modifikation der Basalmembranen und der ECM während der Angiogenese benötigt werden.<sup>[155]</sup> Darüber hinaus wird von einer autokrinen Rolle von IL-8 berichtet, in der das von Endothelzellen produzierte Chemokin selbst auf diese Zellen angiogenetisch wirkt.<sup>[156]</sup>

Die Wirkung von IL-8 auf Endothelzellen wird wie auch bei Neutrophilen über die beiden GPCRs CXCR1 und CXCR2 vermittelt. So exprimieren die Endothelzelllinien ECV304 und *human microvascular endothelial cells* (HMEC) beide Rezeptoren auf relativ hohen Levels während HUVECs eine deutlich geringere Expression zeigen.<sup>[149,157]</sup> CXCR2 bindet an alle ELR<sup>+</sup>-CXC-Chemokine, die Angiogenese induzieren, während CXCR1 hauptsächlich IL-8 mit hoher Affinität bindet. Die Inhibition von CXCR2 führt zur Inhibition der Chemotaxis, der Neovaskularisation (Gefäßneubildung) und der Proliferation von Endothelzellen, während die Inhibition von CXCR1 diese Effekte nicht zeigt. So scheint CXCR2 der Hauptrezeptor für die IL-8 vermittelte angiogenetische Wirkung zu sein.<sup>[158]</sup> Die Zytoskelettorganisation induziert durch IL-8 wird durch eine Kombination beider Rezeptoren vermittelt, die auf verschiedenen Zeitskalen wirken. Während die Inhibition von CXCR1 zur Inhibition der frühen Antwort zwischen 1 und 5 min führt, wird durch die Inhibition des CXCR2 die spätere Phase zwischen 5 und 60 min inhibiert.<sup>[159]</sup>

---

## 2.3 Stand der Technik

---

### 2.3.1 Aktinpolymerisationsassays

---

Um die Aktinpolymerisation in Zellen nachzuweisen, kann der klassische Aktinpolymerisationsassay verwendet werden, der auf Phalloidininfärbung des Aktins beruht. Dieser Assay ist für den Nachweis des charakteristischen Anstiegs der Aktinpolymerisation in Zellen nach Aktivierung durch Chemoattraktanten geeignet. Dafür wird Phalloidin verwendet, das ein toxisches Cyclopeptid isoliert aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) ist und Aktin bindet.<sup>[160,161]</sup> Die Bindung findet jedoch bevorzugt an F-Aktin statt, wodurch die Depolymerisation der Filamente verhindert und das Gleichgewicht von Monomer zu Polymer verschoben wird. Phalloidin ist nicht zellpermeabel, wodurch seine Verwendung mit lebenden Zellen schwierig ist. Jedoch kann nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen F-Aktin in der Zelle mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt und durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden.<sup>[161]</sup> Dazu müssen die mit Chemoattraktant aktivierten Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mit Paraformaldehyd fixiert und ihre Membran permeabilisiert werden, bevor die zunehmende Aktinpolymerisation durch Phalloidininfärbung nachgewiesen werden kann.<sup>[162,163]</sup>

Neben dem klassischen Aktinpolymerisationsassay gibt es noch weitere Varianten zur Färbung der Aktinfilamente. Die Methode der Mikroinjektion ist ein Beispiel dafür.<sup>[164,165]</sup> Es wird dabei fluoreszenzmarkiertes Phalloidin in die Zelle injiziert und das Aktin angefärbt, das fluoreszenzmikroskopisch in einzelnen Zellen betrachtet werden kann. Eine weitere Möglichkeit wird durch das *live imaging* des Zytoskeletts geboten. Dabei exprimiert die Zelle selbst ein fluoreszentes Fusionsprotein aus Aktin und z.B. GFP<sup>[166,167,168]</sup> oder mCherry<sup>[169,170]</sup>, oder ein GFP-markiertes Aktinbindeprotein<sup>[171,172]</sup>, sodass es keiner Einbringung von Phalloidin zur Färbung des Aktins in die Zelle bedarf. Damit kann die Veränderung der Aktinfilamente direkt in der Zelle beobachtet werden, jedoch auch nur mikroskopisch auf Einzelzellebene, da Veränderungen des Zytoskeletts keine Veränderungen der absoluten Fluoreszenzintensität bewirken. Diese Methoden sind fokussiert auf die Dynamik des Zytoskeletts in den Zellen und es ist nur die Beobachtung auf Einzelzellebene möglich. Sie sind nicht zum Test von Inhibitoren geeignet, da sie einerseits teilweise sehr aufwendig in der Durchführung sind und andererseits keine Aussage über eine statistisch signifikante Anzahl an Zellen zulassen.

---

### 2.3.2 Chemotaxisassays

---

Seit über 50 Jahren wird an der Entwicklung von Chemotaxisassays gearbeitet. Dabei steht einerseits die Aufklärung des immer noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus im Fokus. Andererseits wird für eine diagnostische Anwendung die Miniaturisierung sowie Automatisierung angestrebt, denn zur Kosteneffizienz sind kleine Volumina und geringe Zellzahlen von Vorteil. Jedoch ist auch die parallele Durchführung mehrerer Experimente z.B. zum Screening von Inhibitoren ein wichtiger Aspekt. Für Aussagekraft und Reproduzierbarkeit eines solchen Assays ist vor allem der Gradient entscheidend. Er sollte möglichst über Zeit und Raum stabil sein und ein definiertes Profil aufweisen. Es gibt eine Vielzahl von Ansätzen zur Realisierung von löslichen Gradienten. Die Durchführung von Che-



---

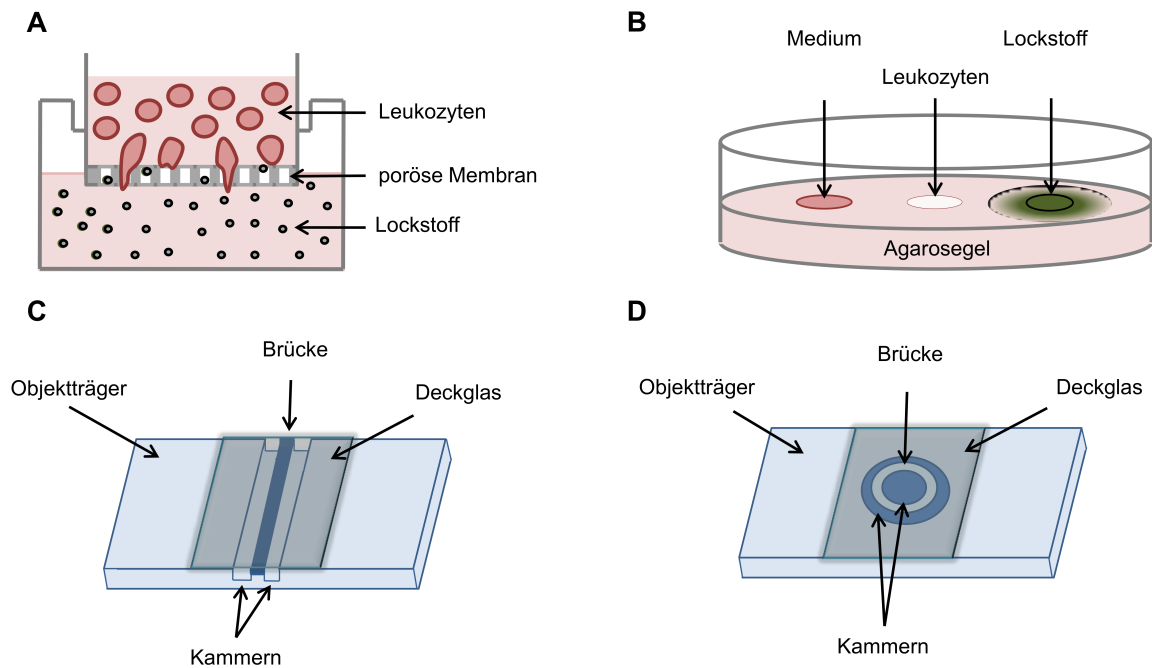
motaxisassays auf Chips kann zur Automatisierung beitragen und eine parallele Durchführung vieler Experimente ermöglichen. Dabei gibt es eine Reihe von Anwendungen, die dieses Ziel verfolgen. Vor allem wird die Mikrofluidik genutzt, um zellbasiertes Screening im Hochdurchsatz durchzuführen und das Zellverhalten zu beobachten. Insbesondere zur Aufklärung des Mechanismus sollen biologische Systeme möglichst genau nachgeahmt werden. Da *in vivo* die Migration von Zellen nicht ausschließlich in Antwort auf einen löslichen Gradienten stattfindet, ist auch die Realisierung solcher Assays mit oberflächengebundenem Gradient von großer Bedeutung. Solche Biochips können Anwendung in vielen Feldern der medizinischen Forschung und Diagnostik, wie in der Immunologie und der Onkologie sowie in der Pharmakologie und Toxikologie, aber auch in der Mikrobiologie finden.

### Traditionelle Chemotaxisassays

Das klassische Beispiel für einen traditionellen Chemotaxisassay stellt die Boyden-Kammer, in abgewandelter Form Transwellassay genannt, dar (Abbildung 2.7A).<sup>[173]</sup> Sie besteht aus einem Insert und einem Reservoir, die durch eine mikroporöse Membran voneinander getrennt sind. Die Zellen befinden sich anfangs im oberen Insert. In dem darunter liegenden Reservoir befindet sich der Lockstoff. Über die Membran bildet sich ein Gradient an Lockstoff aus, der sich jedoch nur über die Membran und damit über einen sehr kleinen Bereich erstreckt. Durch die Poren der zwischen Insert und Reservoir befindlichen Membran können die Zellen entlang dieses Gradienten in das untere Reservoir wandern. Diese Methode ermöglicht die Beobachtung des Effekts von Lockstoffen auf Zellen. Es wird die Zellzahl an migrierten Zellen nach einer definierten Zeit bestimmt und so ein Maß für die Stärke des chemotaktischen Reizes erhalten.<sup>[173]</sup> Dem wird eine Negativkontrolle ohne Lockstoff im Reservoir gegenübergestellt, um den Anteil unspezifischer Migration, der sogenannten Chemokinese, zu bestimmen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen, quantitativen Bewertung, jedoch ist der Gradient nicht über längere Zeit stabil und das Profil zu gegebener Zeit ist nicht bestimmbar. Auch wird eine große Zahl an Zellen und Lockstoff für diesen Assay benötigt und es ist keine Einzelzellantwort auswertbar.

Der Agaroseassay stellt eine weitere Methode zur Untersuchung von Chemotaxis dar (Abbildung 2.7B).<sup>[174]</sup> Dabei werden drei Kammern in ein Agarosegel gestanzt. In die mittlere Kammer werden Zellen gegeben, in die beiden äußeren Lockstoff bzw. Zellkulturmedium als Kontrolle. Durch Diffusion im Agarosegel bildet sich ein Lockstoffgradient um die mit Lockstoff befüllte Kammer aus, der von Zellen erkannt werden kann. Diese können dann in Richtung höherer Lockstoffkonzentrationen migrieren. Diese Migration kann im Mikroskop verfolgt werden, sodass Aussagen über einzelne Zellen getroffen werden können. Der Gradient ist über mehrere Stunden stabil und ein großer Vorteil besteht in seiner dreidimensionalen Ausbildung, wodurch die Zellen analog zur Situation im Gewebe *in vivo* in einer dreidimensionalen Matrix migrieren können. Auch in diesem Fall ist keine Kontrolle über die Form des Gradienten möglich.<sup>[174]</sup>

Einen weiteren, traditionellen Chemotaxisassay stellt die Zigmond-Kammer dar (Abbildung 2.7C).<sup>[94]</sup> Sie besteht aus zwei Kammern in einem Plexiglasobjektträger. Auf dem Objektträger wird ein Deckgläschen befestigt, auf dem sich adhärente Zellen befinden. Die eine Kammer wird mit Lockstoff und die andere mit Zellkulturmedium befüllt. Nach Drehung des Objektträgers auf den Kopf kann zwischen den beiden Kammern durch Diffusion ein linearer Gradient entstehen und die Zellen



**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung traditioneller Chemotaxisassays. A) Die Boyden-Kammer bestehend aus zwei Reservoirs, die durch eine mikroporöse Membran voneinander getrennt sind. Die Zellen werden im oberen Reservoir platziert und der Lockstoff im unteren. Über die Membran bildet sich ein Lockstoffgradient aus, durch welchen die Zellen vom oberen ins untere Reservoir migrieren können. B) Beim Agaroseassay werden drei Löcher in ein Agarosegel gestanzt, in die Medium, Zellen oder Lockstoff gegeben werden. Im Gel bildet sich ein Gradient des Lockstoffs aus, nach dem die Zellen migrieren können. Das Medium dient als Negativkontrolle für ungerichtete Migration. C) Die Zigmond-Kammer besteht aus zwei parallelen Kammern in einem Objektträger. Die eine Kammer wird mit Medium, die andere mit Lockstoff befüllt. Die Anordnung wird mit einem Deckglas bedeckt, auf dem sich adhärente Zellen befinden. Diese können dem Gradienten folgen, der sich über die Brücke ausbildet. D) Die Dunn-Kammer ist eine Weiterentwicklung der Zigmond-Kammer und beruht auf dem gleichen Prinzip, nur dass in diesem Fall die zwei Kammern konzentrisch angeordnet sind.

können entlang diesem migrieren. Die Migration kann mithilfe eines Mikroskops verfolgt werden. Der Vorteil dieser Methode liegt im schnellen Aufbau des Gradienten, der Stabilität des Gradienten über mehrere Stunden und der Vorhersagbarkeit des Gradienten, der mit diesem Verfahren reproduzierbar ist.<sup>[94]</sup> Jedoch ist der Größe des Spalts zwischen der Brücke und dem Deckgläschen entscheidend und der kritische Faktor des Assays. Dieser Abstand muss jedes Mal bestimmt werden, wodurch diese Anwendung sehr aufwendig ist.<sup>[175]</sup>

Eine Weiterentwicklung der Zigmond-Kammer ist die Dunn-Kammer (Abbildung 2.7D).<sup>[175]</sup> Sie besteht aus zwei konzentrischen Kammern in einem Objektträger. Zwischen den Kammern befindet sich eine Brücke, über welche sich ein linearer Gradient ausbildet. Dazu ist die äußere Kammer mit Lockstoff und die innere mit Zellkulturmedium befüllt. Auf den Objektträger wird ein Deckglas mit adhären Zellen gegeben, deren Wanderung im Mikroskop beobachtet werden kann. Der Vorteil der Dunn-Kammer im Vergleich zur Zigmond-Kammer ist, dass sich ein präziser Spalt von 20  $\mu\text{m}$  Dicke zwischen dem Objektträger und dem Deckglas befindet. Durch die Konstruktion ist die Reproduzierbarkeit dieser Spaltdicke gewährleistet. Auch die optischen Eigenschaften und die Langzeitstabilität des Gradienten wurden im Vergleich zur Zigmond-Kammer verbessert.<sup>[175]</sup>

---

Die vorgestellten Methoden und ihre über die Jahre entstandenen Modifikationen weisen jedoch Nachteile auf. Die Form der Gradienten ist bei allen Anwendungen nicht beeinflussbar, da sie durch den Aufbau vorgegeben ist. Auch ist die Stabilität des Gradienten über Zeit und Raum bei den meisten Assays nicht gewährleistet.<sup>[176]</sup>

### Chemotaxisassay in mikrofluidischen Gradienten

Mikrofluidik beschreibt die Wissenschaft von Systemen, die in Kanälen mit Dimensionen von zehn bis mehreren hundert Mikrometern und sehr kleinen Volumina von  $10^{-9}$  bis  $10^{-18}$  L arbeiten.<sup>[177]</sup> Die Generierung von Gradienten mit mikrofluidischen Systemen basiert auf der kontrollierten Diffusion beim Vermischen von Flüssigkeiten im laminaren Strom.<sup>[178]</sup> Der Diffusionsfluss  $J$ , sprich die Anzahl an Molekülen, die pro Zeit durch eine Fläche diffundieren, ist durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben (Gleichung (2.1)).<sup>[179,180]</sup>

$$J = -D\nabla c \quad (2.1)$$

Dabei ist der Fluss  $J$  proportional zum Konzentrationsgradienten  $\nabla c$ , mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  als Proportionalitätsfaktor. Das negative Vorzeichen ergibt sich durch den Fluss entgegen des Konzentrationsgradienten.<sup>[179]</sup>

In einem Mikrosystem dominieren die Oberflächeneffekte über die Diffusionseffekte. Auch sind Massenkraften im Vergleich zu viskosen und elektrostatischen/elektrodynamischen Einflüssen sowie zur Oberflächenspannung vernachlässigbar. Um die Kräfte in Relation zueinander zu bringen, existieren eine Reihe von Koeffizienten.<sup>[181]</sup> Die Reynoldszahl  $Re$  gibt die Beziehung von Massenkraft zur Viskosität an (Gleichung (2.2)).<sup>[180,182]</sup>

$$Re = \frac{Ul}{\nu} \quad (2.2)$$

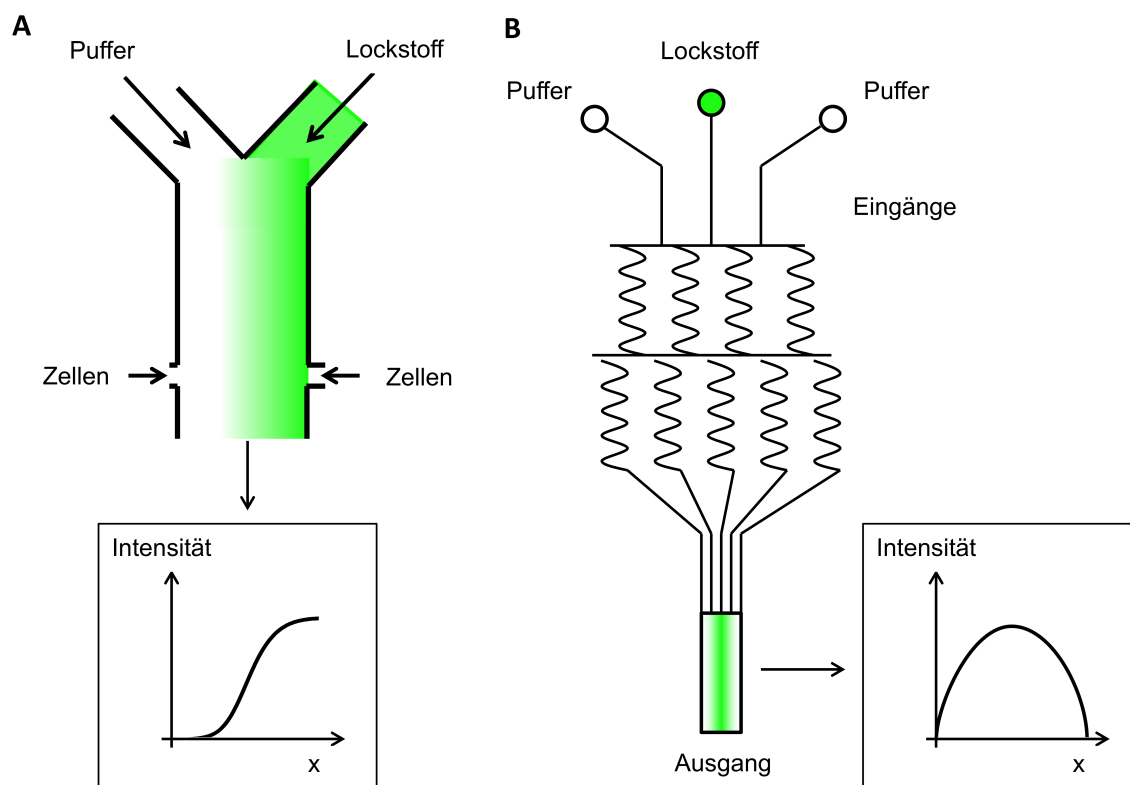
Dabei ist  $U$  die Geschwindigkeit des Fluids,  $\nu$  die Viskosität und  $l$  die eindimensionale Länge des Flusses bzw. des Kanals. In der Mikrofluidik ist die Reynoldszahl mit Werten kleiner als 10 sehr gering und dadurch spielen Viskositätseffekte eine große Rolle.<sup>[180,181,182]</sup>

Eine weitere wichtige Größe ist die Peclet-Zahl (Gleichung (2.3)), die die Beziehung von Advektion, dem Transport eines im Lösungsmittel gelösten Stoffes mit der Strömung, und Diffusion angibt. Je höher die Peclet-Zahl, umso höher ist der Einfluss des Flusses im Vergleich zur Diffusion. In Mikrosystemen ist jedoch die Advektion klein und kann vernachlässigt werden, womit die Diffusion den dominanten Prozess darstellt.<sup>[180,182]</sup>

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (2.3)$$

Mikrofluidische Systeme ermöglichen den Aufbau definierter, stabiler aber auch dynamischer Gradienten. Dabei kann die Geometrie an die gewünschte Größe für Zellapplikationen angepasst werden.<sup>[176]</sup> Ein mikrofluidischer Gradientenaufbau im „Y“-Typ ermöglicht eine einfache und schnelle Darstellung eines linearen Konzentrationsgradienten bei konstantem, linearem Fluss (Abbildung

2.8A).<sup>[183]</sup> Der Gradient ist für Moleküle mit niedrigem Diffusionskoeffizient wie Chemokinen (z.B. IL-8:  $D = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ <sup>[176]</sup>) stabil und es ist möglich, mehrere Lösungen und Zellsuspensionen durch verschiedene Eingänge hinzuzufügen. Auch kann das System mit einer niedrigen Flussrate betrieben werden, wodurch ein niedriger Scherstress auf die Zellen und nur eine kleine Beeinflussung des Flusses im Kanal auf die Richtung des Gradienten entstehen.<sup>[183]</sup>



**Abbildung 2.8:** Mikrofluidische Kanäle. A) Gradientenaufbau im „Y“-Typ mit zwei Eingängen für Lockstoff und Puffer. Im Kanal bildet sich ein Gradient aus, zu dem Zellen zugegeben werden können. Der Querschnitt des in diesem Fall sigmoidealen Profils ist im Diagramm (links unten) dargestellt (modifiziert nach<sup>[183]</sup>). B) Pyramidales Netzwerk zur Erzeugung von Gradienten verschiedener Formen, bei dem durch Vermischung und Zusammenführen mehrerer, paralleler Kanäle durch Diffusion definierte Gradienten entstehen. Der Querschnitt des im gezeigten Fall resultierenden Hügelgradientenprofils ist im Diagramm (rechts unten) dargestellt. Die Form der Gradienten ist variabel über mehrere Eingänge und über Flussratenänderungen steuerbar (modifiziert nach<sup>[178]</sup>).

Dieses System ist in Hinblick auf die Komplexität der Form und der Dynamik des Gradienten noch erweiterbar. Eine Methode dafür stellen pyramidale Netzwerke für komplexe Gradientenformen dar (Abbildung 2.8B).<sup>[178]</sup> Diese Methode beruht auf kontrolliertem Mischen verschiedener Lösungen durch Diffusion, die in einem laminaren Strom durch ein Netzwerk von Mikrokanälen fließen. So sind stabile und vor allem dynamische Gradienten durch Änderung der Flussraten realisierbar. Auch Gradienten verschiedener Größe, Auflösung und Form sind so zugänglich. Die Auflösung der Gradienten, d.h. die örtliche Konzentrationsänderung, kann genau gesteuert werden, was gerade für Zellexperimente ein wichtiger Aspekt ist.<sup>[178]</sup> Es können verschiedenste Konzentrationsprofile generiert werden. Durch die Variation der Lösungen an mehreren Ein- und Ausgängen sind sowohl lineare als auch parabolische oder Sägezahnprofile, je nach Konzentration an dem jeweiligen Eingang, rea-

---

lisierbar. Auch können zwei Gradienten unterschiedlicher Substanzen erzeugt werden, die einander entgegengesetzt verlaufen.<sup>[184]</sup> Über pyramidale Netzwerke dargestellte Gradienten sind über hunderte von Mikrometern und einen langen Zeitraum, solange entsprechende Substanzen weiterhin zugegeben werden, stabil, da die Diffusion ein langsamer Prozess ist.<sup>[184]</sup>

Mikrofluidik findet breite Anwendung bei der Untersuchung von Zellverhalten, da die Bedingungen kontrollierbar und steuerbar sind. So konnte z.B. der Einfluss der IL-8 Konzentration, der Flussrate oder der Diffusion auf die Neutrophilenmigration untersucht werden.<sup>[123,185]</sup> Auch der Einfluss von Scherkräften auf die Zellmigration kann mit dieser Methode analysiert werden.<sup>[186]</sup> Mithilfe von mikrofluidischen Kanälen haben Irimia *et al.* das Migrationsverhalten von Neutrophilen in schaltbaren Gradienten, d.h. Form veränderten Gradienten, untersucht.<sup>[187]</sup> Auch der Einfluss konkurrierender Chemoattraktanten wie IL-8 und LTB<sub>4</sub> in entgegengesetzten Gradienten auf die Migration von Neutrophilen konnte bestimmt werden.<sup>[188]</sup> Die Mikrofluidik ist unabhängig vom Zelltyp. So überprüften Saadi *et al.* den Einfluss von Wachstumsfaktoren und deren Konzentration auf das chemotaktische Verhalten von Brustkrebszellen.<sup>[189]</sup>

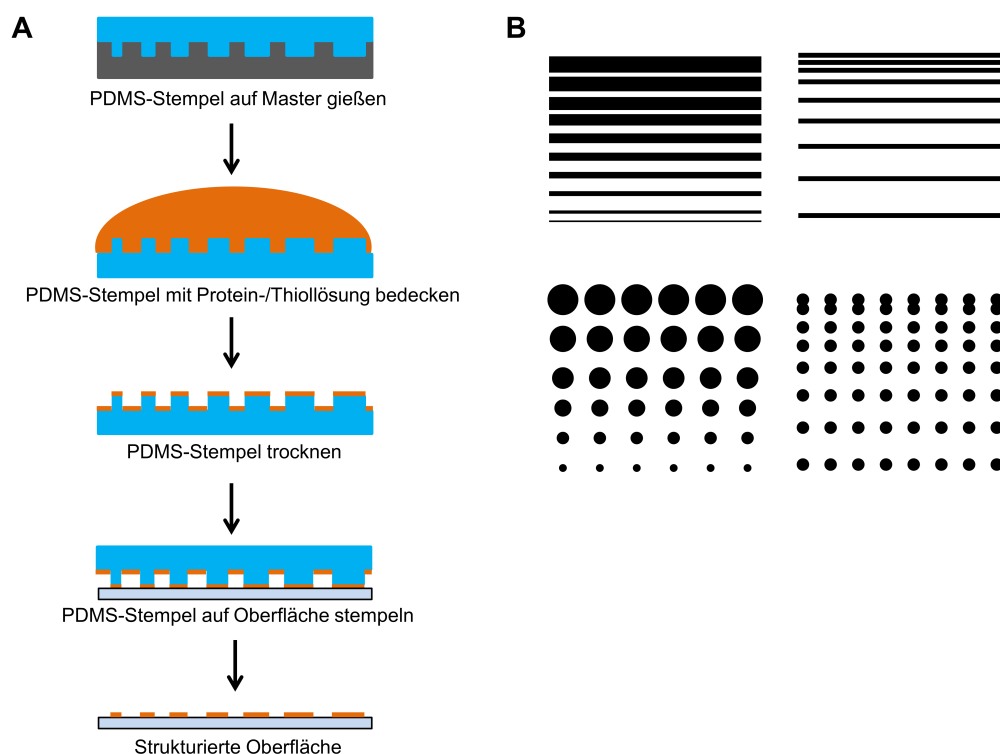
Die Mikrofluidik findet weiterhin Einsatz in der Diagnostik in sogenannten *Point-of-care* (POC) Diagnostiksystemen. Diese *in vitro* Tests sind auch für nicht geschulte Personen anwendbar und dabei stehen eine schnelle Ablesbarkeit des Ergebnisses sowie eine hohe Sensitivität im Vordergrund.<sup>[190]</sup> Solche Tests finden Anwendung für Glukoselevelbestimmungen, Immunoassays und Schwangerschaftstests. Diese Systeme sind in der Lage verschiedene Biomarker wie Proteine, Zellen, Nukleinsäuren, Metabolite und weitere zu detektieren.<sup>[190,191,192,193]</sup>

### **Oberflächenbasierte Chemotaxisassays**

In der Natur spielen nicht nur lösliche, sondern auch oberflächengebundene Gradienten eine Rolle. Das Interesse an Assays zur Untersuchung von Haptotaxis, sprich der Zellmigration in Antwort auf oberflächengebundenen Chemoattraktant, wird zunehmend größer. Prinzipiell sind dabei zwei Schritte von Nöten: die Strukturierung der Oberfläche bzw. die Erzeugung eines Gradienten und die Immobilisierung des Zielproteins.

Eine sehr effektive und kostengünstige Methode zur Generierung von Mustern zur Strukturierung von Oberflächen ist das *Microcontact printing* ( $\mu$ CP). Mithilfe einer photolithographischen Maske werden zunächst Strukturen in metallischen Templaten, sogenannte Master, hergestellt, von denen Abgüsse aus Polydimethylsiloxan (PDMS) angefertigt werden. Diese dienen als Stempel zur Aufbringung eines Musters von Molekülen auf eine ebene Oberfläche (Abbildung 2.9A).<sup>[194]</sup> Proteine können entweder direkt oder indirekt durch  $\mu$ CP immobilisiert werden. So können Moleküle der extrazellulären Matrix direkt auf Gewebekulturen gestempelt werden. Dies stellt eine Möglichkeit zur nicht-kovalenten Bindung von Proteinen, die an Komponenten der extrazellulären Matrix adsorbieren, dar.<sup>[195]</sup> Von Philipsborn *et al.* immobilisierten mit dieser Methode Proteinmuster von *axonal guidance molecules*, um das Wachstum von Axonen zu untersuchen.<sup>[194]</sup> Dominguez *et al.* stempelten das Fusionsprotein Protein A/G, das aus den Fc-Bindedomänen der Proteine A und G entsteht. Über einen chimären Fc-Teil der beiden Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 wurden diese immobilisiert und deren Konzentrationseinfluss auf das Zellverhalten von Lymphozyten in An- und Abwesenheit von Chemokinen zu untersucht.<sup>[196]</sup> Das direkte Stempeln von Proteinen ist jedoch nicht für jedes

Protein geeignet, da die Aktivität beim Kontakt mit der Oberfläche verloren gehen kann und nicht alle Proteine ausreichend auf der gewählten Oberfläche haften.<sup>[194,195]</sup>



**Abbildung 2.9:** *Microcontact printing* als Strukturierungsmethode für Oberflächen. A) Das Verfahren zur Herstellung von strukturierten Oberflächen. Auf einen strukturierten Master wird PDMS gegossen. Dieser PDMS-Stempel wird nach Aushärtung mit Protein- oder Thiollösung bedeckt, sodass die gewünschte Substanz an den Stempel adsorbieren kann. Nach Trocknung des Stempels kann er auf eine Oberfläche durch Druckverfahren gestempelt werden, wodurch das Muster auf die Oberfläche transferiert wird (modifiziert nach<sup>[194]</sup>). B) Verschiedene Linien- und Punktmuster zur Darstellung von diskontinuierlichen Gradienten, die mit diesem Verfahren darstellbar sind.

Eine weitere Variante des  $\mu$ CP ist das Stempeln von langkettigen Thiolen auf eine Goldoberfläche. Dadurch können sich durch Selbstorganisation in den mit Thiolen benetzten Bereichen *self-assembled monolayers* (SAMs) ausbilden. Die Schwefelatome koordinieren die Goldatome auf der Oberfläche und die langkettigen Alkane richten sich in einem  $30^\circ$  Winkel zur Oberfläche in einer dicht gepackten Monolage aus. Die terminale Funktionalität der Alkankette ist dabei variabel und bietet die Möglichkeit, Proteine und andere Biomoleküle auf verschiedene Wege kovalent und nicht-kovalent zu immobilisieren.<sup>[197]</sup> Migliorini *et al.* verwendeten dieses Verfahren, indem sie die SAMs mit Biotin funktionalisierten, an das wiederum Streptavidin binden kann. Da Streptavidin vier Bindestellen für Biotin besitzt, können weitere Biotinmoleküle immobilisiert werden. Diese sind ihrerseits ebenfalls funktionalisiert und es wurden verschiedene Moleküle wie Adhäsionsmolekülen für die zu untersuchenden Zellen, das Chemokin CXCL12 sowie das GAG Heparansulfat auf die Zellreaktion hin untersucht.<sup>[198]</sup> Die Methode des  $\mu$ CPs ist jedoch beschränkt, da kein kontinuierlicher Anstieg der Oberflächenkonzentration darstellbar ist und nur Punkt- oder Linienmuster zur Imitation eines Gradienten verwendet werden können (Abbildung 2.9B).<sup>[195]</sup>

---

Eine weitere Methode zur Darstellung von Linien unterschiedlicher Proteinkonzentration auf Oberflächen kann über mikrofluidische Netzwerke realisiert werden.<sup>[199]</sup> Dabei wird ein Silikonmaster mit parallelen Mikrokanälen verwendet, die jeweils über separate Einlassöffnungen befüllt werden können. Zur Herstellung der Linienmuster werden die Eingänge des Silikonmastes mit verschiedenen Konzentrationen an Proteinlösung befüllt, während ein Silikonelastomer-Stempel auf dem Master liegt und das System schließt. Dabei kann das Protein in den Stempel diffundieren. Anschließend wird mittels *Microcontact printing* das Proteinmuster auf eine Petrischale transferiert. Diese Methode ist jedoch sehr empfindlich, da schon kleinste Verunreinigungen des mikrofluidischen Netzwerkes die genaue Darstellung der Proteinlinien beeinträchtigen können.<sup>[199]</sup> Dertinger *et al.* nutzten pyramidale Netzwerke, um das ECM-Protein Laminin in einem kontinuierlichem Gradienten zu immobilisieren und die Reaktion von Neuronen auf den Gradienten zu testen.<sup>[200]</sup> Dazu wird ein geschlossener Kanal (bestehend aus PDMS, der auf einem Objektträger befestigt ist) mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, an die ein Laminingradient, erzeugt durch das Mikrofluidiknetzwerk, adsorbieren kann. Bei Trennung des Objektträgers vom PDMS können in die beschichteten PDMS-Kanäle Neuronen gegeben und ihr Verhalten im Mikroskop beobachtet werden.<sup>[200]</sup>

Durch die Verwendung von Hydrogelen können ebenfalls kontinuierliche Proteingradienten dargestellt werden.<sup>[201]</sup> Dazu wird zu einem flachen Agarosestempel eine Proteinlösung gegeben, die in die Agarose diffundieren kann. Anschließend wird Wasser auf den Stempel gegeben und das Protein kann durch Diffusion in dem Stempel einen kontinuierlichen Gradienten ausbilden. Durch anschließendes Stempeln des Gels auf einen Aldehyd-funktionalisierten Objektträger wird der Proteingradient auf die Oberfläche transferiert und kovalent gebunden. Die dargestellten kontinuierlichen Gradienten können einfach und schnell generiert werden und sind durch genaue Einstellung der Diffusionsbedingungen reproduzierbar.<sup>[202]</sup> Diese Methode wurde bislang nur von Mayer *et al.* für das Protein BSA vorgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde an die Methode angeknüpft, um einen Haptotaxisassay basierend auf kontinuierlichen Chemokingradienten auf Oberflächen für Leukozyten zu entwickeln. Eine weitere Möglichkeit bei der Verwendung von Hydrogelen zur Gradientenerzeugung besteht darin, Kapillaren in einem Hydrogel mit Proteinlösung zu befüllen. Dabei kann das Protein ebenfalls in das Hydrogel diffundieren und einen kontinuierlichen Gradienten ausbilden.<sup>[203]</sup>

Die Photolithographie stellt eine weitere Methode zur Immobilisierung von Gradienten dar. Eine mit BSA beschichtete Oberfläche kann durch Photobleichen mit einem fluoreszenzmarkierten Molekül immobilisiert werden.<sup>[204]</sup> Die Methode des *laser-assisted protein adsorption by photobleaching* (LAPAP) beruht auf der Bestrahlung der Lösung eines Fluorophor-Konjugats, z.B. Biotin-4-Fluorescein, über einer BSA beschichteten Oberfläche mit einem Laser. Dadurch wird das Konjugat kovalent an die Oberfläche gebunden.<sup>[205]</sup> Durch Verwendung eines Filters mit einer Schwarz-Weiß- bzw. einer Grauskala, eines LCD-Displays oder durch Schreiben mit einem Laser kann die Oberfläche strukturiert werden.<sup>[205]</sup><sup>[206]</sup> Durch anschließende Bindung von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin kann die Immobilisierung des Biotins nachgewiesen werden.<sup>[205]</sup> Es können auch fluoreszenzmarkierte Antikörper mit LAPAP auf der Oberfläche gebunden werden, um entsprechende, an den Antikörper bindende Moleküle zu immobilisieren.<sup>[206]</sup> Durch eine maskenlose Projektion sind mit dieser Methode Proteinmuster verschiedener Form und Dichte darstellbar, so auch kontinuierliche Gradienten.<sup>[207]</sup> Ein weiteres Beispiel für die Verwendung der Photochemie zur Oberflächenimmobilisierung

---

ist die Bindung von Ni-NTA-Maleimid an thiolfunktionalisierte SAMs, um His-getaggte Chemokine zu immobilisieren und auf Zellantwort hin zu untersuchen. Zur Darstellung eines kontinuierlichen Gradienten wurde der thiolfunktionalisierte SAM durch Photooxidation mit einer Maske, die kontrolliert über die Oberfläche verschoben wurde, selektiv oxidiert und somit inaktiviert.<sup>[208]</sup>



---

## 3 Zielsetzung

Die Chemotaxis von Zellen ist ein fundamentaler Prozess des Immunsystems, der u.a. durch kleine Signalproteine, sogenannte Chemokine, gesteuert wird. Wegen der Beteiligung von Chemokinen an vielen Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen, Allergien oder Krebs sind sie seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Es sind noch lange nicht alle Zusammenhänge und Einflussfaktoren bekannt, sodass es die Chemotaxis weiter aufzuklären gilt. Auch stellt die Entwicklung und Charakterisierung von Chemokininhibitoren einen wichtigen Aspekt dar, um Therapien für chemokinvermittelte Krankheiten voranzubringen. Dazu werden verschiedene Zellaktivitäts- und Migrationsassays benötigt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung solcher Assays für die Untersuchung der Chemotaxis von Zellen in Antwort auf Chemokine. Zunächst soll das rekombinant hergestellte Chemokin CXCL8 oder Interleukin-8 (IL-8) hinsichtlich seiner Struktur und Aktivität charakterisiert werden, um als Chemoattraktant für die Assays eingesetzt zu werden. Als chemotaktisch responsives Zellsystem für IL-8 werden primäre neutrophile Granulozyten verwendet. Da deren Handhabung kompliziert und aufwändig ist und das Zellverhalten in einzelnen Chargen variiert, soll ein alternatives Zellsystem identifiziert werden. Dazu sollen mit dem CXCR1-Rezeptor transfizierte HEK293-Zellen sowie verschiedene Endothelzelltypen auf ihr chemotaktisches Verhalten nach Aktivierung durch IL-8 untersucht werden.

Nach Optimierung des Zellsystems soll weiterhin eine Reihe von literaturbekannten Aktivitäts- und Migrationsassays etabliert werden; einerseits für weitere Untersuchungen des Zellsystems sowie für die Charakterisierung weiterer, rekombinant hergestellter Chemokine und andererseits zum Test von Inhibitoren. Dazu wird das von Helmer *et al.* vorgeschlagene Inhibitorpeptid IL8RPLoops für IL-8 in den etablierten Assays auf seine inhibitorische Wirkung untersucht. Es sollen Verfahren zur Messung von Chemotaxis im *High-Throughput Screening* (HTS) Format entwickelt werden. Neben der Chemotaxis soll ein alternativer Ansatz verfolgt werden. Die Aktinpolymerisation ist die zelluläre Einleitung der Zellmigration und kann somit als Vorstufe der Chemotaxis gesehen werden. Ein Assay für Aktinpolymerisation in lebenden Zellen könnte ein geeignetes Screeningverfahren für Inhibitoren darstellen und soll daher im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

Weiterhin steht die Entwicklung von Assays auf Einzelzelebene im Fokus, mit denen der Einfluss verschiedener Proteine auf die gerichtete Migration untersucht werden kann. Dazu soll einerseits ein Haptotaxisassay zur Untersuchung von Zellmigration in Antwort auf immobilisiertes Chemokin realisiert werden. Vorangegangene Arbeiten haben die Schwierigkeit der Anwendung diskontinuierlicher Gradienten für kleine Zellen und somit die Notwendigkeit eines kontinuierlichen Gradienten herausgearbeitet, womit der Fokus auf diesen liegt. Es soll eine Strategie zur Gradientenerzeugung und Immobilisierung entwickelt werden, wobei die Erhaltung der Aktivität des unmodifizierten Chemokins einen wichtigen Aspekt darstellt. Die Kontrollierbarkeit des Gradienten hinsichtlich Form und Konzentrationsgefälle stellt dabei einen sehr wichtigen Punkt dar, da der Gradient auf die Größe und das Verhalten der Zelle abgestimmt sein muss. Die Zellen müssen in der Lage sein, den Konzentrationsgradienten zu erkennen, damit sie in Richtung größerer Konzentrationen migrieren können.

---

Außerdem ist die Chemotaxis konzentrationsabhängig, wodurch ein geeigneter Konzentrationsbereich durch den Gradienten abgedeckt werden muss. Die Reaktion und Migration der Zellen auf den Oberflächen sind zu testen und die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich des Migrationsverhaltens zu evaluieren. Dazu ist ein geeignetes Verfahren zu identifizieren. Als weiterer Migrationsassay auf Einzelzellebene sollen mikrofluidische Kanäle zur Generierung von Gradienten verwendet werden, die bereits eine breite Anwendung für diese Zwecke finden. In Kooperation mit Dr. Suman Narayan aus den Materialwissenschaften soll dieses System für Chemokine entwickelt werden. Dabei soll zunächst die Erzeugung und Charakterisierung von Gradienten erfolgen, die im nächsten Schritt hinsichtlich des Gradientenverlaufs und der Konzentration auf die Zellen angepasst werden sollen.

---

## 4 Material und Methoden

---

### 4.1 Allgemeine Materialien und Chemikalien

---

Alle allgemeinen Materialien und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: VWR International (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), Corning (Kaiserslautern, Deutschland), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Sartorius AG (Göttingen, Deutschland), GE Healthcare (München, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG (Braunschweig, Deutschland), Roche (Grenzach-Whylen, Deutschland).

---

#### 4.1.1 Häufig verwendete Puffer

---

In Tabelle 4.1 sind häufig verwendete Puffer und ihre Zusammensetzung aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer unter Verwendung von Milli-Q-Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt.

**Tabelle 4.1:** Häufig verwendete Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer A; pH 7,4	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 90 mM NaCl
Puffer B; pH 7,4	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 M NaCl
Puffer C; pH 7,4	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 35 mM NaCl
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS); pH 7,4	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 137 mM NaCl; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,7 mM KCl
Hank's Balanced Salt Solution (HBBS)	137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 6 mM Glucose; 0,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,8 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1,3 mM CaCl <sub>2</sub> ; 4,2 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 20 mM HEPES

---

#### 4.1.2 Medien

---

Tabelle 4.2 zeigt die verwendeten Nährmedien für Bakterien und Säugerzellen sowie Zusätze.

**Tabelle 4.2:** Verwendete Nährmedien und Zusätze.

Name	Hersteller
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG
RPMI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EGM <sup>™</sup> -2 BulletKit <sup>™</sup>	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin-EDTA 0,05 %	AppliChem, Gattersleben, Deutschland
Gentamycin G-418	Carl Roth GmbH & Co. KG

---

#### 4.1.3 Proteine, Proteinmarker und Antikörper

---

In Tabelle 4.3 sind Antikörper, spezielle Proteine und verwendete Proteinmarker aufgelistet.

**Tabelle 4.3:** Verwendete Antikörper, Proteine und Proteinmarker.

Name	Hersteller
Anti-humanes Interleukin-8 IgG Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FITC-konjugiertes anti-humanes Interleukin-8 IgG Maus, polyklonal	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
HRP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG Ziege, polyklonal	Carl Roth GmbH & Co. KG
HRP-konjugiertes anti-Maus IgG Ziege, polyklonal	Carl Roth GmbH & Co. KG
Humanes IL-8	AK Schmitz, TU Darmstadt, Deutschland
Humanes IL-8-S72C	AK Schmitz, TU Darmstadt, Deutschland
Humanes <sup>15</sup> N-IL-8	AK Schmitz, TU Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG
<i>BLUEplus prestained Protein Ladder</i> (10 - 180 kDa)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

##### **Vollblut**

Das Vollblut entstammt freiwilligen Spendern und wurde von geschultem Fachpersonal des *medical airport service* GmbH in Darmstadt entnommen.

##### **Buffy Coat**

Die *Buffy Coats* entstammen anonymisierten Blutspendern und entstehen bei der Verarbeitung der Vollblutspende als Nebenprodukt. *Buffy Coats* enthalten vor allem Leukozyten und Blutplättchen. Sie werden vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg/Hessen gGmbH in Frankfurt bezogen.

##### **THP-1**

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 (DMSZ-Nr. ACC-16) entstammt ursprünglich dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter Monozytenleukämie. Die Zellen sind phagozytotisch, weisen die Rezeptoren Fc und C3b auf und besitzen keine Oberflächen- oder monozytische Immunoglobine.<sup>[209]</sup> Auch haben sie weiterhin die Fähigkeit, in Antwort auf das Chemokin MCP-1 zu migrieren.

##### **HEK293**

*Human embryonic kidney* (HEK) oder HEK293-Zellen (DMSZ-Nr. ACC-305) sind humane embryonale Nierenzellen. Diese permanente Zelllinie wurde durch Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen mit Teilen der DNA des humanen Adenovirus 5 (Ad5) erhalten und existiert seit fast 40 Jahren.<sup>[210]</sup> Für diese Arbeit wurden die Zellen zunächst mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1 stabil transfiziert.<sup>a</sup> Es wurden zwei verschiedene Klone, B8 und C11, der transfizierten HEK293-Zellen verwendet. Zusätzlich wurden HEK293-Zellen verwendet, die neben dem Rezeptor CXCR1 auch EGFP (HEK293-CXCR1/EGFP) exprimieren.<sup>b</sup>

##### **HUVEC**

*Human umbilical vein endothel cells* (HUVEC) sind Primärzellen und entstammen aus dem Endothelium der Nabelschnurvene. Sie werden häufig als *in vitro* Modellsystem für die Untersuchung der Funktion von Endothelzellen sowie der Angiogenese verwendet.<sup>c</sup>

##### **ECFC**

Die ECFC (*endothelial colony-forming cells*) sind primäre Endothelvorläuferzellen und entstammen ebenfalls der Nabelschnurvene.<sup>[211]d</sup>

---

<sup>a</sup> Durchgeführt von Dipl.-Chem. Marina Jöst, AK Schmitz.

<sup>b</sup> Von Jean-Luc Galzi, Ph.D., Straßburg, zur Verfügung gestellt.

<sup>c</sup> Von Prof. (apl.) Dr. Karen Bieback, Mannheim, zur Verfügung gestellt.

<sup>d</sup> Von Prof. (apl.) Dr. Karen Bieback, Mannheim, zur Verfügung gestellt.

## 4.2 Geräte und Software

In Tabelle 4.4 sind die wichtigsten, in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit ihrer Bezeichnung und der Herstellerangabe aufgelistet.

**Tabelle 4.4:** Verwendete Geräte.

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
<i>semi-dry</i> Blotting System	Owl <sup>™</sup> -HEP-1	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer, HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
HPLC	ÄKTApurifier 10	GE Healthcare, München, DE
HPLC	LC20-AD	Shimadzu, Duisburg, DE
LC-Massenspektrometer	LCMS 2020	Shimadzu, Duisburg, DE
Mikrotiterplatten- Lesegerät mit Injektions- vorrichtung	Infinite <sup>®</sup> M1000	Tecan Group AG, Maennedorf, CH
Mikrotiterplatten- Lesegerät	Infinite <sup>®</sup> F200	Tecan Group AG, Maennedorf, CH
Geldokumentationsstation	LAS-3000	Fujifilm, Minato, Präfektur Tokio, JPN
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin Electronics GmbH & CO KG, Berlin, DE

Tabelle 4.5 gibt eine Übersicht über die verwendete Software.

**Tabelle 4.5:** Verwendete Software.

Software	Anwendungsbereich	Hersteller
LabSolutions	Chromatographie	Shimadzu, Duisburg, DE
Unicorn Control	Chromatographie	GE Healthcare, München, DE
GraphPad Prism 6	Statistiksoftware	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ	Bildverarbeitung	Wayne Rasband
LOCi Tools	PlugIn für ImageJ	Bio-Formats
MTrackJ	PlugIn für ImageJ	Erik Meijering
Axio Vision	Mikroskopiedaten	Carl Zeiss AG, Oberko- chen, DE

LCMS Solution Software	LC-MS	Shimadzu, Duisburg, DE
PyMol Molecular Graphics System	Proteinstrukturen	Schrödinger, New York, USA

---

## 4.3 Proteinchemische Methoden

---

### 4.3.1 Proteinexpression und -reinigung

---

#### Interleukin-8 wt, 72 aa Variante

*E. coli* BL21 (DE3) RIL wurden mit dem Vektor pET-22b/CXCL8 (wt-IL8-22b) transformiert. Dieser Vektor enthält eine für IL-8 kodonoptimierte Sequenz. Die Expression erfolgt in Anlehnung an das Protokoll von Wiese und Schmitz.<sup>[212]</sup>

20 mL LB-Medium versetzt mit  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  Ampicillin werden mit den transformierten *E. coli* kultiviert und über Nacht bei 220 rpm und  $37^\circ\text{C}$  angewachsen. 800 mL steril autoklaviertes LB-Medium mit  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  Ampicillin in einem 2 L-Erlenmeyerkolben werden mit der Übernachtskultur inokuliert. Die Zellen werden bei  $37^\circ\text{C}$  und 220 rpm vermehrt, bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,8 bis 1,0 erreicht ist. Die Expression wird mit einer Endkonzentration von 0,1 mM IPTG induziert. Es wird 3 h bei  $30^\circ\text{C}$  und 160 rpm exprimiert. Anschließend wird die Zellsuspension bei  $4500 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 45 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Nach dem Auftauen wird das Zellpellet mit 5 mL des Lysis-Puffers (1 mM EDTA,  $0,2\text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym,  $0,1\text{ mg mL}^{-1}$  DNase I, 1/4 Proteaseinhibitortablette (cOmplete™ Mini, Roche) in Puffer A) resuspendiert und 1,5 h auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wird die Suspension mehrmals invertiert. Anschließend werden  $50\mu\text{L}$  Triton X-100 zugegeben und gut vermischt. Es folgt eine Ultraschallbehandlung von dreimal 30 s bei maximaler Intensität. Anschließend werden  $100\mu\text{L}$  einer  $0,1\text{ mg mL}^{-1}$  DNase I Lösung zugegeben und es wird für 30 min bei RT inkubiert. Im folgenden Hitzeschritt wird die Suspension bei  $70^\circ\text{C}$  im Wasserbad für 10 min inkubiert und anschließend bei  $18000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 45 min zentrifugiert.

Der Lysatüberstand wird steril filtriert und mittels Kationenaustauschchromatographie am ÄKTApurifier 10 System (GE Healthcare) gereinigt. Dazu wird eine 5 mL HiTrap SP FF Säule (GE Healthcare) mit zwei Säulenvolumen (CV) Puffer A äquilibriert. Die Säule wird mit dem filtrierten Lysatüberstand mit einer Flussrate von  $1\text{ mL min}^{-1}$  beladen. Es folgt ein Waschschriff mit 3 CV Puffer A, um nicht gebundenes Protein zu eluieren. Anschließend werden die positiv geladenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 30 % Puffer B über 10 CV eluiert. Die Detektion des eluierenden Proteins erfolgt anhand der UV-Messung bei 280 nm und das Protein wird in Fraktionen à 3 mL gesammelt. Diese werden vereinigt und in einem Centricon (Viaspin 20, Satorius) nach Herstellerangaben gegen Wasser entsalzt. Anschließend folgt ein weiterer Reinigungsschritt durch Umkehrphasenchromatographie über eine Nucleosil C8 RP (250 x 10 mm, Macherey & Nagel) an einer HPLC LC20-AD mit einem Zweipumpensystem und einem Photodiodenarraydetektor SPD20A. Die entsalzte Proteinlösung wird auf die Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von  $2\text{ mL min}^{-1}$  eluiert. Der Lauf beginnt

---

bei 100 % Eluent A (95 % Wasser, 5 % Acetonitril und 0,1 % TFA) und das Protein wird in einem linearen Gradienten von 0 - 100 % Eluent B (5 % Wasser, 95 % Acetonitril und 0,1 % TFA) über ca. 6 CV eluiert.

### <sup>15</sup>N-Interleukin-8

*E. coli* BL21 (DE3) RIL wurden mit dem Vektor pET-22b/CXCL8 (wt-IL8-22b) transformiert. Eine Kolonie wird von ausgestrichenen ÜN-Kulturen in 5 mL LB-Medium mit 60 µg mL<sup>-1</sup> Ampicillin überführt und bei 37 °C und 200 rpm vermehrt. Die ÜN-Kulturen werden in 1 L LB-Medium mit 60 µg mL<sup>-1</sup> Ampicillin gegeben und es wird bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,0 kultiviert. Bei Erreichen dieser Zelldichte werden die Zellen für 45 min bei 4500 x g zentrifugiert und das Pellet in 1 L M9-Medium (Tabelle 4.6) resuspendiert. Nach einer zweistündigen Kultivierung der Zellen bei 37 °C und 200 rpm wird die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mM IPTG Endkonzentration induziert und das Protein ÜN bei 30 °C und 200 rpm exprimiert. Die Zellsuspension wird anschließend 4500 x g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Die Zellyse und Reinigung erfolgen analog zu IL-8 wt.

**Tabelle 4.6:** Zusammensetzung des M9-Minimalmediums.

---

#### Zusammensetzung bezogen auf 1 L Medium

---

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl

0,5 g NaCl

1 g Glucose

auf 950 mL auffüllen, pH auf 7,5 einstellen, auf 1 L auffüllen, autoklavieren

anschließend werden

1 mL Fe<sub>3</sub>Cl (100 mM) steril filtriert

2 mL MgSO<sub>4</sub> (1 M) steril filtriert

1 mL CaCl<sub>2</sub> (1 M) steril filtriert

hinzugegeben

### IL-8-S72C

*E. coli* BL21 (DE3) RIL wurden mit dem Vektor pET-22b/CXCL8S72C (IL8-S72C-22b) transformiert, der mit einem Cystein an der 72. Position anstatt eines Serins ausgestattet ist. Die Expression und Reinigung des IL-8-S72C erfolgen in Anlehnung an das Protokoll von Wiese und Schmitz analog zu IL-8 wt.<sup>[212]</sup>



#### BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen kann der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (Thermo Fisher Scientific) verwendet werden. Dazu wird Reagenz A mit Reagenz B im Verhältnis 98:2 zusammengegeben. Je 95  $\mu\text{L}$  der Mischung werden in einer Kavität einer transparenten 96er Mikrotiterplatte (Sarstedt) vorgelegt. Es wird eine Konzentrationsreihe mit Lysozym oder BSA zur Kalibration verwendet. Es werden je 5  $\mu\text{L}$  der Verdünnungen und 5  $\mu\text{L}$  der zu bestimmenden Probe unverdünnt und 1:10 verdünnt in Dreifachbestimmung zu den Kavitäten mit BCA-Lösung hinzugegeben. Es wird für 1 h bei RT inkubiert. Die photometrische Bestimmung erfolgt bei 560 nm mit den Mikrotiterplattenlesegeräten TECAN F200 oder M1000.

#### Absorptionsmessung bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung von IL-8

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration stellt die Absorptionsmessung bei 280 nm dar. Für eine Kalibriergerade von IL-8 wird das Gewicht von entsalztem und lyophilisiertem IL-8 gravimetrisch bestimmt und eine 10  $\text{mg mL}^{-1}$  Proteinlösung in Puffer C hergestellt. Ausgehend von dieser Konzentration wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dreimal 18  $\mu\text{L}$  je Proteinverdünnungen werden in eine UV-transparente 384er Mikrotiterplatte (Corning) gegeben und die Platte wird bei 3000 x g für 10 s zentrifugiert. Anschließend erfolgt die photometrische Bestimmung bei 280 nm am Tecan M1000. Für die Kalibriergerade werden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Absorption bei 280 nm der IL-8 Lösungen unbekannter Konzentration wird auf die gleiche Weise bestimmt und anhand der so erstellten Kalibriergerade die Konzentration berechnet. Die Geradengleichung der Kalibriergerade ist in Gleichung (4.1) angegeben.

$$y = 0,122x + 0,079 \quad (4.1)$$

#### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Reinheitsbestimmung der rekombinant exprimierten Proteine wird eine SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt. Die Proben werden mit 2x oder 5x Lämmli-Puffer versetzt (Tabelle 4.7) und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Glasplatten und Spacer werden in der Gießvorrichtung (BioRad) zusammengebaut und der Aufbau auf Dichtigkeit überprüft. Für das Trenngel werden Wasser, Tris-Puffer pH 8,8, Acrylamid und SDS zusammengegeben und vermischt (Tabelle 4.7). Direkt vor dem Befüllen der Gelkammern (BioRad) werden Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben, gut vermischt und die Lösung direkt in die Kammern gefüllt. Zum oberen Rand bleiben 1.5 - 2 cm frei. Das Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet und 20 - 30 min gewartet, bis das Gel auspolymerisiert ist. Anschließend wird das Isopropanol vorsichtig abgegossen. Das Sammelgel wird wie das Trenngel vorbereitet (Tabelle 4.7), auf das Trenngel gegeben und der Kamm wird für die Probenaschen vorsichtig in das Sammelgel gesteckt. Nach 20 - 30 min ist das Gel auspolymerisiert. Die Gele werden in die Gelkammer eingebaut, mit SDS-Laufpuffer überschichtet und mit 15 - 30  $\mu\text{L}$  Probe beladen. Um die Molekulargewichte der Proteine abschätzen zu können, werden je Gel 3  $\mu\text{L}$  Proteinmarker (*BLUEplus prestained Protein Ladder*, Biomol) in eine Tasche aufgetragen. Bei einer Spannung

von 120 V wird die SDS-PAGE durchgeführt, bis die Lauffront gerade das Ende des Gels erreicht. Zur Detektion werden die Gele nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE über Nacht in kolloidaler Coomassie-Lösung (Tabelle 4.7) inkubiert. Es folgen mehrere Waschstschritte mit dest. Wasser, bis keine Färbung des Waschwassers mehr erkennbar ist. Die Gele werden anschließend mithilfe eines Scanners (Brother MFC-8860 DN) dokumentiert.

**Tabelle 4.7:** Lösungen und Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x Lämmli-Puffer	4 % SDS; 20 % Glycerol; 10 % 2-Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,16 M Tris-Puffer, pH 6,8
5x Lämmli-Puffer	10 % SDS; 50 % Glycerol; 25 % 2-Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau; 0,31 M Tris-Puffer, pH 6,8
18 %iges Trenngel	1,3 mL Wasser; 2,5 mL 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8; 6 mL 30 %ige Acrylamidlösung <sup>e</sup> ; 100 µL 10 %ige SDS-Lösung; 100 µL 10 %ige APS-Lösung; 4 µL TEMED
5 %iges Sammelgel	2,3 mL Wasser; 1 mL 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8; 40 µL 10 %ige SDS-Lösung; 670 µL 30 %ige Acrylamidlösung <sup>f</sup> ; 40 µL 10 %ige APS-Lösung; 2,5 µL TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris; 193 mM Glycin; 3,5 mM SDS
Kolloidale Coomassie-Lösung	10 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 10 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,12 % Coomassie G250; 20 % Methanol

## Western Blot

Der Western Blot dient zur spezifischen Identifizierung von Proteinen mit Antikörpern. Dazu werden die mit einer Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine für weitere Analysen elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH & Co. KG) transferiert. Das „Blotten“ erfolgt in einem „halb-Nassverfahren“ mit dem Thermo Scientific System. Die PVDF-Membran wird zunächst mit Methanol aktiviert und anschließend in Wasser und Blot-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert. Filterpapiere (Whatman, GE Healthcare) werden zehn Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Der Aufbau erfolgt folgendermaßen: Kathode, fünf Filterpapiere, SDS-Gel, Membran, fünf Filterpapiere, Anode. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen den Filtern des Gels und der Membran sind. Der Proteintransfer erfolgt über 45 min für eine Membran mit der Größe eines Gels bei einer Spannung von 80 mA und für zwei Membranen der Größe eines Gels bei 160 mA.

Um unspezifische, freie Bindungsstellen der PVDF-Membran zu blockieren, wird für 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C mit 5 % Magermilchpulver (Sucofin) in PBS geblockt. Anschließend wird der in PBS verdünnte Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um überschüssigen Primärantikörper von der Membran zu entfernen, wird dreimal für jeweils 5 min mit

<sup>e</sup> Acrylamid:Bisacrylamid 29:1

<sup>f</sup> Acrylamid:Bisacrylamid 29:1

---

PBS-T-Puffer (PBS mit 0,1 % Tween-20) gewaschen. Anschließend wird der an Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: *horseradish peroxidase*) gekoppelte und in PBS 1:1000 verdünnte Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Es wird erneut dreimal mit PBS-T-Puffer gewaschen, um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die Detektion erfolgt mit einem Luminol-ECL-Chemolumineszenz-Reagenz (ECL Start, GE Healthcare). Dazu wird die Membran mit der Lösung benetzt und die Detektion der Chemolumineszenz findet im *Image Analyzer* LAS-3000 statt.

### **Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)**

Zur Identifizierung von Sekundärstrukturelementen in Proteinen und Peptiden wurden CD-Spektren aufgenommen.<sup>g</sup> Für die Messung werden 25  $\mu$ M Proteinlösung in Puffer C hergestellt. Es wird das J-810 Spektropolarimeter von Jasco verwendet. Hierbei wird der Bereich von 260 nm bis 195 nm zehnmal bei konstanter Temperatur von 20 °C gescannt. Es wird in 1 nm Intervallen mit einer Scanrate von 50 nm min<sup>-1</sup> gemessen. Als Leerwert wird der Puffer C ebenfalls gemessen.

---

### **4.3.3 Proteinkonjugation**

---

#### **Biotinylierung und selektive Fluoreszenzmarkierung von Interleukin-8-S72C über das C-terminale Cystein**

Zunächst werden mögliche Dimere, die durch intermolekulare Disulfidbrücken über die C-terminalen Cysteine des IL-8-S72C entstehen können, mit *Immobilized TCEP Disulfide Reducing Resin* (Thermo Scientific) reduziert. Dazu wird das Harz dreimal mit Waschpuffer (PBS, 20 mM EDTA) gewaschen. Es wird 1 mL einer 1 mg mL<sup>-1</sup> IL-8-S72C-Lösung in Waschpuffer auf 3 - 4 Äquivalente Harz gegeben und für 60 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Harzpartikel werden 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL-Gefäß überführt. Das Harz wird mit 200  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen, erneut zentrifugiert, und der Überstand wird zu der Proteinlösung gegeben. Anschließend wird in vierfachem Überschuss 3-(N-Maleimidopropionyl)-Biocytin (Cayman Chemical Company, Ellsworth, Michigan, USA) bzw. Fluorescein-5-maleimid (AAT Bioquest, Inc, Sunnyvale, Californien, USA) in DMF zugegeben und für mindestens 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene Reaktionslösung wird mittels Gelfiltration an der HPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare) gereinigt. Der Reaktionsansatz der Proteinkonjugation wird auf eine mit 1 CV Puffer C äquilibrierte 53 mL HiPrep 26/10 Desalt Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Es folgt eine isokratische Elution mit 2 CV des Puffers C bei einer Flussrate von 3 mL min<sup>-1</sup>. Die Detektion des Proteins erfolgt anhand der UV-Messung bei 280 nm und das Protein wird in Fraktionen à 1,3 mL gesammelt, die anschließend vereinigt werden. Von den vereinigten Proteinfraktionen der Gelfiltration wird eine LC-MS<sup>h</sup> zur Bestimmung der enthaltenen Proteine durchgeführt.

#### **FITC-Markierung von Proteinen**

Es wird 1 mL einer 2 mg mL<sup>-1</sup> Proteinlösung in 50 mM Natriumborat-Puffer pH 8,5 mit 20-fachem Überschuss an FITC-Lösung in DMF für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Tren-

---

<sup>g</sup> Durchgeführt von Philipp Czechowski, AK Reggelin.

<sup>h</sup> Von Dipl.-Ing. Sebastian Hörner, Dipl.-Ing. Sascha Knauer und Dr. Heiko Fittler, AK Kolmar, TU Darmstadt, durchgeführt.

---

nung des FITC-markierten Proteins von nicht reagiertem FITC erfolgt über eine Gelfiltration an der ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare) analog zur Biotinylierung von IL-8-S72C.

---

## 4.4 Zellbiologische Methoden

---

---

### 4.4.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten

---

#### Isolierung mit Lymphoprep™

Es werden zu gleichem Volumen Vollblut oder *Buffy Coat*, 6 %ige Dextran 500-Lösung (in PBS) und PBS zusammengegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei setzt sich ein Großteil der Erythrozyten ab. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und es wird für 10 min bei 15 °C und 240 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen und erneut für 10 min bei 15 °C und 240 x g zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 mL PBS aufgenommen und vorsichtig auf 30 mL Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, Dundee, Großbritannien) gegeben, um mononukleare Zellen und weitere Erythrozyten abzutrennen. Das Gemisch wird für 20 min bei 4 °C und 600 x g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand und das weiße Band, das sich in der Mitte der Lösung bildet und aus mononuklearen Zellen besteht, werden vorsichtig abgenommen, das rote Pellet in PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 4 °C und 240 x g zentrifugiert. Das Pellet wird mit PBS gewaschen. Anschließend werden die restlichen Erythrozyten durch einen hypotonischen Schock zum Platzen gebracht, indem zu dem in 5 mL PBS resuspendierten Pellet 25 mL Milli-Q-Wasser gegeben werden. Nach 30 s werden 17,2 mL einer 3,6 %igen Natriumchlorid-Lösung zugefügt, und es wird für 10 min bei 4 °C und 240 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird mit PBS und Chemotaxispuffer (RPMI mit 0,2 % BSA) gewaschen. Die isolierten neutrophilen Granulozyten werden in Chemotaxispuffer resuspendiert und für Chemotaxisversuche verwendet.

#### Isolierung mit Histopaque®

Es werden 3 mL Histopaque®-1119 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in ein 15 mL Reaktionsgefäß gegeben und vorsichtig mit 3 mL Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, Dundee, Großbritannien) überschichtet. Anschließend wird mit 6 mL *Buffy Coat* überschichtet und bei 700 x g und RT für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Es bilden sich mehrere Schichten. Die oberste Schicht besteht aus Plasma und Thrombozyten gefolgt von einem weißen Band, dass Monozyten und Lymphozyten enthält. Darunter folgt eine Schicht mit hauptsächlich neutrophilen Granulozyten und wenigen Erythrozyten. Die unterste Schicht nimmt den Großteil des Volumens ein und enthält hauptsächlich Erythrozyten. Es werden vorsichtig das Plasma und das weiße Band abgenommen und nur die Neutrophilen enthaltene Schicht in ein neues 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden zweimal mit PBS und einmal mit Chemotaxispuffer gewaschen. Die isolierten neutrophilen Granulozyten werden in Chemotaxispuffer resuspendiert und für Chemotaxisversuche verwendet.

---

#### 4.4.2 Allgemeine Kulturbedingungen

---

Die experimentellen Arbeiten zur Kultivierung von Zellen werden ausschließlich an einer sterilen Werkbank (Thermo Scientific Herasafe KS, mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II) und mit sterilen Arbeitsgeräten durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgt in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in einem 5 %igen CO<sub>2</sub>-Luftgemisch.<sup>i</sup>

---

#### 4.4.3 Kultivierung von Suspensionszellen

---

##### **HL-60, THP-1 und Jurkat**

Die Zellen werden in RPMI-Medium mit 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg mL<sup>-1</sup> Streptomycin kultiviert. Alle zwei bis drei Tage werden die Flaschen lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht, das Medium gewechselt und die Zellkulturen geteilt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Nach Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen für 5 min bei 200 x g zentrifugiert, das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das PBS entfernt und die Zellen entweder weiterkultiviert oder für Zellversuche verwendet.

---

#### 4.4.4 Kultivierung von adhärenenten Zellen

---

##### **HEK293-CXCR1, HEK293-CXCR1/EGFP, HUVEC und ECFC**

Die Zellen werden in dem jeweiligen Medium (Tabelle 4.8) mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U mL<sup>-1</sup> Penicillin und 100 µg mL<sup>-1</sup> Streptomycin kultiviert. Sobald die Zellpopulation konfluent gewachsen ist, müssen die Zellen passagiert werden. Dafür wird zunächst das Medium entfernt und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Anschließend werden pro 75 cm<sup>2</sup> Flasche 300 µL einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und überschüssige Lösung wird entfernt. Bis zum sichtbaren Ablösen des Zellrasens wird das Kulturgefäß im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt, indem auf 37 °C vorgewärmtes Medium mit Supplementen zugegeben wird. Die Zellen werden vorsichtig in dem Medium resuspendiert und somit vereinzelt. Je nach gewünschter Verdünnung werden die Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und gegebenenfalls mit Medium oder zusätzlichen Supplementen versehen (Tabelle 4.8). Die für einen Versuch benötigten Zellen werden nach dem Trypsinieren für mind. 1,5 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre ruhen gelassen und gegebenenfalls mit zusätzlichen Supplementen versetzt (Tabelle 4.8).

---

<sup>i</sup> Die Kultivierung der Zellen wurde von Dipl.-Chem. Marina Jöst und Dipl.-Biol. Anke Imrich durchgeführt.

**Tabelle 4.8:** Zelllinien und deren Medien.

Zelllinie	Medium	zusätzliche Supplemente
HEK293 Wildtyp	DMEM	
HEK293-CXCR1	DMEM	350 µg mL <sup>-1</sup> G-418
HEK293-CXCR1/EGFP	MEM/DMEM	350 µg mL <sup>-1</sup> G-418
HUVEC	EGM™ -2	
ECFC	EGM™ -2	

#### 4.4.5 Bestimmung der Zelldichte

##### Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wird eine 0,5 %ige Trypanblaulösung verwendet, die abgestorbene Zellen blau färbt. Dazu wird ein Teil einer Zellsuspension (10 µL) mit 40 µL Trypanblaulösung versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung erfolgt lichtmikroskopisch bei 10 - 40fache Vergrößerung. Die Zellzahl ergibt sich dabei nach Formel (4.2).

$$\text{Zellzahl/mL} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 \quad (4.2)$$

##### Calcein-AM

Die Zelldichte kann auch fluorimetrisch durch Färbung der Zellen mit Calcein-AM (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Californien, USA) erfolgen. Dazu werden die Zellen mit 1,5 µM Calcein-Lösung für 20 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und können entweder im Versuch verwendet oder direkt am Tecan M1000 bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm bei optimaler Verstärkung gemessen werden. Die absolute Zellzahl entspricht 100 % und die Zellzahl der jeweiligen Proben wird in prozentualen Anteilen angegeben, indem die Emissionswerte in Relation zur Kontrolle mit der absoluten Zellzahl gesetzt werden.

##### Resazurin

Eine fluorimetrische Alternative im roten Kanal bietet die Verwendung von Resazurin. Dazu wird eine Resazurinlösung in PBS zu den Zellen mit einer Endkonzentration von 0,01 mg mL<sup>-1</sup> hinzugegeben. Nach einer Inkubation für mind. 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erfolgt die Messung der Fluoreszenzintensität am Tecan M1000 bei einer Exzitationswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm bei optimaler Verstärkung. Die absolute Zellzahl entspricht 100 % und die Zellzahl der jeweiligen Proben wird in prozentualen Anteilen angegeben, indem die Emissionswerte in Relation zur Kontrolle mit der absoluten Zellzahl gesetzt werden.

---

## 4.5 Zellmigrationsassays

---

### 4.5.1 Transwellassay mit Suspensionszellen

---

Um das Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten zu untersuchen, wird in Anlehnung an die Boyden-Kammer<sup>[173]</sup> ein Transwellassay mit 96er bzw. 24er Transwellplatten (Corning, Merck Millipore) mit 3  $\mu\text{m}$  Porengröße durchgeführt. Die folgenden Volumina sind für eine 96er Transwellplatte angegeben. Die für die 24er Transwellplatte verwendeten Volumina entsprechen jeweils dem Dreifachen der angegebenen Menge.

Die Polycarbonatmembran der Inserts wird zunächst für 1 - 2 h mit 50  $\mu\text{L}$  einer 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pro  $\text{cm}^2$  Ratten-Kollagen Typ IV (Roche) bei Raumtemperatur beschichtet. Kurz vor der Verwendung der Transwellplatten werden die Inserts mit PBS gewaschen. Hierfür wird die Kollagenlösung abgesaugt und 100  $\mu\text{L}$  PBS in die Inserts gegeben und einige Minuten äquilibriert. Im Anschluss wird das PBS abgesaugt und die Inserts werden mit Zelllösung beladen. Für den Assay werden  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Insert verwendet. In die Inserts werden 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension gegeben (entspricht  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ). In die unteren Kavitäten werden 150  $\mu\text{L}$  Chemotaxispuffer als Negativkontrolle bzw. 150  $\mu\text{L}$  Chemokinlösung in Chemotaxispuffer gegeben. Zur Normalisierung der Zellmigration wird die für den Versuch eingesetzte Zellzahl ( $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Insert) direkt in die untere Kammer gegeben, sodass diese der Gesamtzellzahl entspricht. Hierfür werden 100  $\mu\text{L}$  Chemotaxispuffer vorgelegt und 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension dazugegeben. Das Insert bleibt für diese Kontrolle leer. Nach 90-minütiger Inkubation werden die Inserts entfernt und die Zellzahl bestimmt. Dies geschieht entweder durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer, durch Fluoreszenzfärbung der Zellen mit Calcein-AM oder durch Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch die Zellen (Kapitel 4.4.5).

Für die Untersuchung der Wirkung verschiedener Testsubstanzen auf die IL-8 induzierte Migration von neutrophilen Granulozyten wird der oben beschriebene Assay verwendet. Die Substanzen werden mit IL-8 in Chemotaxispuffer gemischt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird wie oben beschrieben verfahren.

---

### 4.5.2 Transwellassay mit adhärenenten Zellen

---

Um den chemotaktischen Einfluss von IL-8 auf die mit dem CXCR1-Rezeptor transfizierten HEK293- und verschiedene Arten von Endothelzellen zu untersuchen, wird ein Transwellassay mit 96er Transwellplatten (Corning) mit 8  $\mu\text{m}$  Porengröße durchgeführt. Für den Assay werden  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Inserts in 50  $\mu\text{L}$  verwendet. In die Inserts werden 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension gegeben (entspricht  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ). In die unteren Kavitäten werden 150  $\mu\text{L}$  Chemotaxispuffer als Negativkontrolle bzw. 150  $\mu\text{L}$  Chemokinlösung gegeben. Zur Normalisierung der Zellmigration wird die für den Versuch eingesetzte Zellzahl ( $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Insert) direkt in die untere Kammer gegeben, sodass diese der Gesamtzellzahl entspricht. Hierfür werden zunächst 100  $\mu\text{L}$  Chemotaxispuffer vorgelegt und 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension dazugegeben. Das Insert bleibt für diese Kontrolle leer.

Für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung eines anti-IL-8-Antikörpers auf die IL-8 induzierte Migration der Zellen wird der oben beschriebene Assay verwendet. Der Antikörper wird mit IL-8

---

in Chemotaxispuffer gemischt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird wie bereits beschrieben verfahren.

Nach dreistündiger Inkubation werden die Inserts entfernt und die Zellzahl über die Resazurinumsatzung durch die Zellen bestimmt. Da sich in die untere Kammer migrierende, adhärente Zellen nicht ablösen und in Suspension vorliegen, sondern an der Membran adhäriert bleiben, muss die Zellzahl der an der Membran adhären Zellen bestimmt werden. Dazu werden zunächst die Zellen, die sich noch innerhalb der Inserts befinden und nicht adhäriert sind, mit Hilfe eines Papiertuchs entfernt. Die Inserts werden mit 50  $\mu\text{L}$  Medium gewaschen und zu der im Reservoir befindlichen Lösung werden 10  $\mu\text{L}$  einer 0,15  $\text{mg mL}^{-1}$  Resazurinlösung in PBS (Endkonzentration 0,01  $\text{mg mL}^{-1}$ ) zugegeben. Die Inserts werden erneut eingesetzt und es wird für mind. 3 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgt die fluorimetrische Bestimmung am Tecan M1000 bei einer Exzitationswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm bei optimaler Verstärkung.

---

#### 4.5.3 Statistische Auswertung der Transwellassays

---

Für die statistische Auswertung der Transwellassays werden Hypothesentests verwendet, die eine Bewertung der Signifikanzniveaus zwischen verschiedenen Datensätzen erlauben. Für den Vergleich des Mittelwerts zweier Datensätze wird der Student t-Test verwendet. Für den Vergleich der Mittelwerte mehrerer Datensätze wird ein *One-way ANOVA* mit dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Signifikanzniveaus: signifikant\*:  $p < 0,05$ ; sehr signifikant\*\*:  $p < 0,01$ ; hoch signifikant\*\*\*:  $p < 0,001$ ; höchst signifikant\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . Es wurde die Software GraphPad Prism 6 für die Auswertung verwendet.

---

#### 4.5.4 Agarosespotassay

---

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Chemotaxis bietet die Verwendung eines Agarosespotassays.<sup>[213]</sup> Es wird eine 0,5 %ige Agaroselösung in Wasser durch Erhitzen hergestellt. Wenn die Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt ist, werden 90  $\mu\text{L}$  der Agaroselösung mit 10  $\mu\text{L}$  PBS, 10  $\mu\text{L}$  Chemokin (1,25  $\mu\text{M}$ ) in PBS oder 10  $\mu\text{L}$  Chemokin mit Antikörper in PBS zusammengegeben. Anschließend werden Tropfen von je 5  $\mu\text{L}$  auf einen Glasobjektträger gegeben, der zuvor mit Ethanol gründlich gereinigt worden ist. Nachdem die Spots ausgehärtet sind, werden 1 - 2 mL einer Zellsuspension in Zellkulturmedium mit 10 % FKS auf die Glasoberfläche gegeben. Der Objektträger wird in einer Petrischale für 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert und anschließend werden die nicht-adhären Zellen abgenommen. Es wird neues Medium mit 0,1 % FKS zugegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre inkubiert. In dieser Zeit können die Zellen migrieren und es kann im Phasenkontrast des Mikroskops die Anzahl der in den Spot migrierten Zellen im Vergleich zu Negativkontrolle mit nur PBS ausgewertet werden.



---

#### 4.5.5 Haptotaxisassay

---

##### **Herstellung der Agarosestempel**

Eine 3 %ige Agaroselösung (NEEO, Carl Roth GmbH & Co. KG) wird in der Mikrowelle erhitzt und in die Kavitäten einer 384-Well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International GmbH) gegossen. Die Platte wird für 5 min bei 800 x g zentrifugiert und bei 4 °C bis zur Aushärtung der Agarose gekühlt. Anschließend werden die Stempel vorsichtig mit einer Pinzette aus den Kavitäten herausgenommen und auf eine Länge von ca. 5 mm gekürzt. Die resultierende Stempelgröße beträgt 3,6 · 3,6 mm. Die Stempel können in einer luftdicht verschlossenen Mikrotiterplatte bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden.

##### **Herstellung der Proteingradienten und der Stempelprozess**

5 µL einer 15 mg mL<sup>-1</sup> Proteinlösung in Puffer C werden auf einen Glasobjektträger (VWR International) gegeben und der Stempel wird vorsichtig mit der langen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt und inkubiert. Anschließend wird der Stempel mit Wasser gespült und getrocknet. Mit der Stempelgröße nach unten wird der Stempel vorsichtig auf eine Petrischalenoberfläche (Greiner Bio-One International GmbH) gelegt und leichter Druck ausgeübt, um den Kontakt der gesamten Stempelgröße mit der Oberfläche sicherzustellen. Der Stempel wird für 60 s auf der Oberfläche inkubiert und die Stempelgröße auf der Petrischale markiert.

##### **Modifizierte Herstellung der Proteingradienten**

Für die modifizierte Methode der Gradientenerzeugung wird der Stempel wie oben beschrieben in die Proteinlösung gelegt. Wenn diese vollständig in den Agarosestempel eingezogen ist, nach ca. 60 min, wird Wasser an die Unterseite des Stempels auf den Objektträger gegeben und weiter inkubiert. Nach dem Waschen und Trocknen des Stempels wird wie oben beschrieben mit dem Stempelprozess weiter verfahren.

##### **Detektion der immobilisierten Proteingradienten auf der Oberfläche**

Die mit BSA-FITC gestempelten Oberflächen können direkt mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Observer) im grünen Kanal (43HE) analysiert werden. Die IL-8 Oberflächen werden mit je 10 µL einer 10 µg mL<sup>-1</sup> FITC-markierten anti-humanen IL-8 Antikörperlösung in PBS für 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Oberflächen gründlich mit PBS gewaschen und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss Observer) im grünen Kanal (43HE) analysiert. Für die Aufnahme der Oberflächen wird eine 2,5fache Vergrößerung verwendet. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgt mit der Software ImageJ 1.47v<sup>[214]</sup> und dem Plugin LOCI Tools.

##### **Abschätzung der immobilisierten Proteinmenge auf der Oberfläche**

Mithilfe von Agarosestempeln werden kleine Agarosespots auf eine Petrischalenoberfläche gestempelt. Je 5 µL IL-8 Lösung definierter Konzentration werden auf einem Agarosespot getrocknet und mit 10 µg mL<sup>-1</sup> FITC-markiertem anti-humanen IL-8 Antikörper in PBS für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der fluoreszenten Oberflächen erfolgt wie oben beschrieben. Die resultierenden Fluores-

zenzintensitäten werden mit ImageJ<sup>[214]</sup> ausgewertet. Eine Kalibriergerade der IL-8 Menge pro Fläche gegen die Fluoreszenzintensität wird erstellt, um die immobilisierte IL-8 Menge auf der Oberfläche abhängig von der Fluoreszenzintensität abschätzen zu können.

### Haptotaxisassay mit neutrophilen Granulozyten

Frisch isolierte neutrophile Granulozyten werden auf den IL-8 Gradienten für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Oberfläche gründlich mit PBS gewaschen und mit 3 mL Chemotaxispuffer bedeckt. Im Phasenkontrast des Mikroskops wird die markierte Stempelfläche bei einer 10fachen Vergrößerung so positioniert, dass der Bereich des höchsten Anstiegs des Gradienten beobachtet werden kann. Das Zellverhalten wird über eine Zeitspanne von 3 h beobachtet, wobei alle 60 s ein Bild aufgenommen wird.

### Datenanalyse der Haptotaxis

Die Analyse der während der Zellmigrationsversuche aufgenommenen Bilder erfolgt mit ImageJ<sup>[214]</sup>. Dazu wird das Plugin MTrackJ verwendet und es werden x,y-Koordinaten für die Migration über die Zeit generiert. Anhand dieser Daten können Zelltrajektorien erstellt werden, die eine statistische Aussage über die Direktheit und Geschwindigkeit der Zellmigration ermöglichen. Die weitere Auswertung erfolgt mit MATLAB (MATLAB and Statistics Toolbox Release 2012b; The MathWorks, Natick, MA).<sup>j</sup>

Da der Gradient im Experiment aus technischen Gründen nicht perfekt entlang der y-Achse justierbar ist, wird die Richtung des Gradienten für jedes individuelle Experiment angepasst. Dazu werden die erhaltenen Zellvektoren eines Experiments derart rotiert, dass der Vektor des mittleren Winkels aller Zelltrajektorien parallel zur y-Achse liegt. Diese modifizierten Daten werden für alle weiteren Analysen verwendet. Wichtig an dieser Stelle zu erwähnen ist, dass diese Prozedur nicht die Migrationswerte beeinflusst, da nur der mittlere Vektor aus allen Migrationsvektoren rotiert wird.

Zur Untersuchung einer ungerichteten Migration wird ein Rayleigh-Test durchgeführt, welcher einen Hypothesentest darstellt.<sup>[215]</sup> Dabei wird die Nullhypothese einer ungerichteten Migration in einer zirkularen Verteilung getestet. Bei einer Widerlegung dieser Nullhypothese migrieren die Zellen entlang einer Vorzugsrichtung. Unter der Annahme, dass lediglich ein vorliegender Konzentrationsgradient gerichtete Migration verursacht, ist die Widerlegung der Nullhypothese einer Migration entlang eines Konzentrationsgradienten gleichgesetzt. Gleichung (4.3) gibt die Berechnung des Rayleigh-Tests an.

$$X = \sum_{n=1}^N n \cdot \cos(\theta_n), Y = \sum_{n=1}^N n \cdot \sin(\theta_n), R^2 = X^2 + Y^2, R^* = R/N^{3/2} \quad (4.3)$$

Bei dem Rayleigh-Test werden zunächst alle Migrationsvektoren auf Einheitslänge normiert und bilden den Winkel  $\theta_n$  zur Richtung des gegebenen Gradienten. Ein Winkel von  $\theta_n = 0$  entspricht einem Vektor parallel zum Gradienten, während ein Vektor mit einem Winkel von  $\theta_n = 90$  senkrecht zu dem Gradienten steht. Entsprechend zu Gleichung (4.3) werden die Kosinus- und Sinuswerte der

<sup>j</sup> In Zusammenarbeit mit Jan Rink, M.Sc., TU Darmstadt.

Winkel aller Migrationsvektoren aufaddiert und die gemittelte Vektorlänge  $R$  berechnet. Bei ungerichteter Bewegung heben sich die einzelnen Sinus- und Kosinuswerte in der Summe auf. In diesem Fall werden  $X$  und  $Y$  und somit auch  $R$  im Mittel Null, womit sich der Schwerpunkt der migrierten Zellen nicht vom Startpunkt entfernt.  $R^*$  ist in Tabellen hinterlegt und kann für eine Quantifizierung der gerichteten Bewegung herangezogen werden.<sup>[215]</sup>

Der Migrationsanteil, den eine einzelne Zelle in y-Richtung zurücklegt, kann durch den *Forward Migration Index<sub>j</sub>* ( $FMI_j$ ) dargestellt werden (Gleichung (4.4)).<sup>[216]</sup>

$$FMI_j = \frac{y_{end} - y_1}{l_i} \quad (4.4)$$

Dabei ist  $y_{end}$  die y-Koordinate des Endpunktes der Migration und  $y_1$  die y-Koordinate des Startpunktes der Migration einer einzelnen Zelle. Die gesamte zurückgelegte Strecke  $l_i$  einer Zelle ist durch Gleichung (4.5) definiert:

$$l_i = \sum_{i=2}^{n_{Schritte}} \left( (x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.5)$$

Der  $FMI$  aller Zellen wird durch die Summe der  $FMI_j$  der Einzelzellen erhalten, die durch die gesamte Zellzahl  $J$  dividiert wird (Gleichung (4.6)).

$$FMI = \sum_{j=1}^J \frac{FMI_j}{J} \quad (4.6)$$

Analog zum  $FMI$  kann der x-Anteil der Migration durch den *Sideward Migration Index<sub>j</sub>* ( $SMI_j$ ) für einzelne Zellen und der  $SMI$  für alle Zellen berechnet werden (Gleichung (4.7) und (4.8)):

$$SMI_j = \frac{x_{end} - x_1}{l_i} \quad (4.7)$$

$$SMI = \sum_{j=1}^J \frac{SMI_j}{J} \quad (4.8)$$

Eine Aussage über die *Geradlinigkeit* der Migration unabhängig von der Richtung kann über die Gleichungen (4.9) und (4.10) erfolgen (ibidi, <http://ibidi.com/applications/chemotaxis/chemotaxis-parameters/>, zuletzt abgerufen am 07.01.2016):

$$Geradlinigkeit_j = \frac{\left( (x_{end} - x_1)^2 + (y_{end} - y_1)^2 \right)^{\frac{1}{2}}}{l_i} \quad (4.9)$$

$$Geradlinigkeit = \sum_{j=1}^J \frac{Geradlinigkeit_j}{J} \quad (4.10)$$

Die Quantifizierung der Präzision der Zellmigration entlang eines gegebenen Gradienten erfolgt unter Verwendung des *Chemotactic Precision Index (CPI)* <sup>[217]</sup>, der durch Gleichung (4.11) definiert ist (vgl. Kapitel 5.3.2).

$$CPI = \cos(\phi) \cdot FMI \cdot (1 - |SMI|) = \frac{FMI^2}{Geradlinigkeit} \cdot (1 - |SMI|) \quad (4.11)$$

Dabei gibt  $\phi$  den Winkel zwischen dem Richtungsvektor des Gradienten und der direkten Verbindungslinie zwischen Anfangs- und Endpunkt der mittleren Trajektorie aller Zellen an und der Kosinus von  $\phi$  kann durch den Quotienten aus *FMI* und *Geradlinigkeit* dargestellt werden. Durch die Multiplikation dieses Werts mit dem *FMI* wird der Migrationsanteil in y-Richtung, also entlang des Gradienten, mit einbezogen und darauf normiert. Durch Multiplikation mit  $1 - |SMI|$  wird zusätzlich der Migrationsanteil in x-Richtung, also senkrecht zum Gradienten, berücksichtigt.

Alle Werte für die *Geradlinigkeit*, den *FMI*, den *SMI* und den *CPI* sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler (*SEM*) angegeben. Die Geschwindigkeiten der Zellen wurden aus jedem einzelnen Migrationsschritt der Zellen bestimmt und die Standardabweichungen unter Annahme einer Normalverteilung berechnet.

---

## 4.6 Zellaktivitätsassays

---



---

### 4.6.1 Klassischer Aktinpolymerisationsassay

---

Der Aktinpolymerisationsassay testet die Aktivität von Chemokinen auf Zellen und kann auch zum Test von Inhibitoren verwendet werden. Dazu werden frisch isolierte neutrophile Granulozyten mit einem Zelltitert von  $10^6$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$  in Zellkulturmedium ohne Phenolrot verwendet. Es werden  $400 \mu\text{L}$  des reinen Puffers als Negativkontrolle bzw. der zu testenden Chemokin- bzw. Chemokin/Inhibitorlösung in Medium in einem  $1,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäß vorgelegt. Zur Fixierung der Zellen werden in einer schwarzen 96er Mikrotiterplatte (Corning) pro Probe je zehn Kavitäten mit  $50 \mu\text{L}$  kaltem Stopppuffer (6% Formaldehyd in PBS) vorgelegt. Zu den Lösungen werden je  $100 \mu\text{L}$  der Zellsuspension hinzugegeben. Es werden direkt nach Zugabe sowie zu folgenden Zeitpunkten je  $50 \mu\text{L}$  der Zell-/Aktivierungslösung entnommen und zu den  $50 \mu\text{L}$  Stopppuffer hinzugegeben: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 240 und 300 s (10 Zeitpunkte pro Probe). Anschließend wird die Platte bei RT für 30 min inkubiert, bevor je  $50 \mu\text{L}$  PBS pro Kavität hinzugefügt werden. Die Mikrotiterplatte wird für 5 min bei  $1200 \times g$  zentrifugiert und es werden je  $100 \mu\text{L}$  des Überstands abgenommen. Zur Permeabilisierung

der Zellmembranen werden je 100  $\mu$ L einer 0,3 %igen Triton X-100 Lösung in PBS hinzugegeben und es wird für mind. 4 min bei RT inkubiert. Anschließend wird erneut zentrifugiert, mit 100  $\mu$ L einer 0,2 %igen BSA-Lösung in PBS gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Es werden je 25  $\mu$ L der Phalloidin-Lösung in 0,2 %iger BSA-Lösung hinzugefügt. Die verschiedenen verwendeten Phalloidin-Konjugate sind in Tabelle 4.9 mit den entsprechenden eingesetzten Konzentrationen aufgeführt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT werden je Kavität 100  $\mu$ L PBS zugegeben und die Mikrotiterplatte wird zentrifugiert, bevor die Kavitäten je zweimal mit PBS gewaschen werden. Anschließend wird die Fluoreszenzintensität bei den entsprechenden Wellenlängen (Tabelle 4.9) am Tecan M1000 bei optimaler Verstärkung gemessen.

**Tabelle 4.9:** Verwendete Phalloidin-Konjugate und dazugehörige Exzitations- und Emissionswellenlängen.

Bezeichnung	Hersteller	Eingesetzte Konzentration	Ex/Em
Phalloidin-Atto488	Sigma-Aldrich	40 nM	501/523 nm
Phalloidin-Atto565	Sigma-Aldrich	40 nM	563/592 nm
Phalloidin-iFluor555	Biomol	80 nM	556/574 nm

#### 4.6.2 Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen

**Tabelle 4.10:** Verwendete Puffer für den Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Hypotonischer Puffer, pH 7,4	130 mM Saccharose, 50 mM KCl, 50 mM Kaliumacetat, 20 mM HEPES
3:2-Puffer	3 Teile hypotonischer Puffer, 2 Teile Milli-Q-Wasser
Permeabilisierungslösung	Saponin, 6 mM ATP
Aktivierungslösung	5 ng mL <sup>-1</sup> IL-8, 6 nM Phalloidin-Atto565

In einer schwarzen 96-Well-CellBIND® Platte (Corning) mit transparentem Boden werden am Vortag jeweils 70000 Zellen pro Kavität in 100  $\mu$ L Zellkulturmedium mit entsprechenden Supplementen (Tabelle 4.2) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Am darauf folgenden Tag wird der Überstand komplett abgenommen und es wird mit 100  $\mu$ L PBS gewaschen. Es werden je drei Negativkontrollen mitgeführt, die weder mit Permeabilisierungs- noch mit Aktivierungslösung behandelt werden. Auch werden Kontrollen durchgeführt, die je nur mit einer der beiden Lösungen behandelt werden. Die Permeabilisierungs- und die Aktivierungslösungen sind täglich frisch anzusetzen. Die Permeabilisierungslösung besteht aus Saponin (Carl Roth GmbH & Co. KG) in verschiedenen Konzentrationen in 3:2-Puffer, das gegebenenfalls mit 6 mM ATP versehen wird. In die Kavitäten wird je 80  $\mu$ L Permeabilisierungslösung zugegeben und es wird für 5 bzw. 10 min bei RT

---

oder auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Aktivierungslösung, je  $20\mu\text{L}$  pro Kavität, zugegeben, die sowohl 6 nM Phalloidin-Atto565 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als auch Chemoattraktant enthält. In der Negativkontrolle ist nur Phalloidin-Atto565 enthalten. Es wird sofort die Fluoreszenzmessung von unten bei einer Exzitationswellenlänge von 563 nm und einer Emissionswellenlänge von 592 nm bei einer Verstärkung von 180 am Mikrotiterplattenlesegerät Tecan M1000 über eine Zeitspanne von 60 min mit 1 min Intervallen gestartet. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und es kann ein Zellviabilitätsassay mit Resazurin (Kapitel 4.4.5) durchgeführt werden.

---

## 4.7 Mikrofluidik

---

Die Mikrofluidik wurde in Kooperation mit Dr. Suman Narayan und Asma Siddique, M.Phil. (AK Prof. Dr. Stark, TU Darmstadt) durchgeführt. Dort fand die Herstellung und Optimierung der Kanäle sowie die notwendigen Beschichtungen statt.

### Aufbau der Kanäle

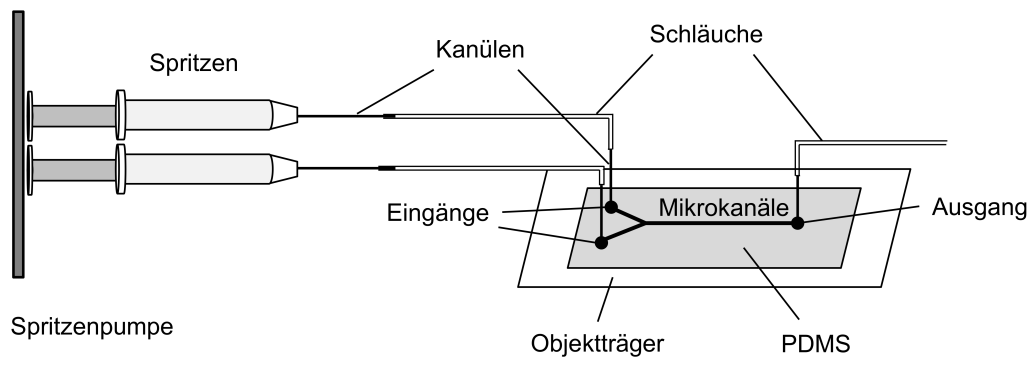
Die Kanalstrukturen werden durch Gießen von Polydimethylsiloxan (PDMS) auf einen entsprechend strukturierten Master erhalten. Das hydrophobe PDMS wird nach Aushärtung mit Sauerstoffplasma behandelt. Dadurch werden sauerstoffhaltige, funktionelle Gruppen auf der Oberfläche erzeugt, die weiterhin mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) funktionalisiert werden. Über die Aminofunktion des APTES wird Rattenkollagen I (Life Technologies) kovalent immobilisiert, das einerseits die Oberfläche hydrophil macht und andererseits eine optimale Oberfläche für die Zellmigration bildet. An die Ein- und Ausgänge der Kanäle werden vorsichtig mit einer Kanüle Löcher eingestanz, die für die spätere Verwendung nötig sind. Abschließend wird ein Objektträger mit Sauerstoffplasma behandelt und auf das PDMS gedrückt, sodass der Kanal geschlossen ist.<sup>k</sup>

### Herstellung von Gradienten

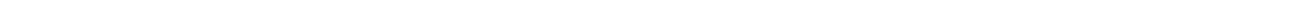
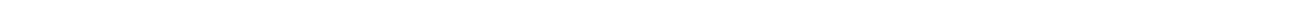
Es werden zwei bzw. drei 1 mL Spritzen, abhängig von der Anzahl an Eingängen, mit PBS oder IL-8-S72C-Fluorescein Lösung in PBS befüllt. An die Spritzen werden über Kanülen dünne Schläuche befestigt, die zunächst mit der jeweiligen Lösung befüllt werden. Am Ende der Schläuche befinden sich ebenfalls dünne Kanülen, die in die vorgestanzten Löcher im PDMS gesteckt werden. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Ein weiterer Schlauch wird am Ausgang befestigt. Die Spritzen werden in eine Spritzenpumpe (*World Precision Instruments, Inc.*, Sarasota, USA) eingespannt und es wird ein Fluss von  $0,5\mu\text{L min}^{-1}$  eingestellt. Mithilfe des Mikroskops kann der Gradient zu verschiedenen Zeitpunkten im grünen Fluoreszenzkanal (43HE) detektiert und aufgenommen werden.

---

<sup>k</sup> Dieser Teil wurde von Dr. Suman Narayan und Asma Siddique, M.Phil., AK Prof. Dr. Stark, TU Darmstadt durchgeführt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des Mikrofluidikaufbaus.





---

# 5 Ergebnisse

---

## 5.1 Charakterisierung von Chemokinen und chemokinresponsiven Zellen

---

---

### 5.1.1 Herstellung und Charakterisierung des Chemokins Interleukin-8 und Derivaten

---

Zur Entwicklung von Aktivitätsassays und eines oberflächenbasierten Haptotaxisassays wurde ein Modellsystem benötigt, anhand dessen die Assays optimiert werden konnten. Interleukin-8 (IL-8), auch CXCL8 genannt, ist ein CXC-Chemokin, dessen chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten bekannt ist.<sup>[40]</sup> Das rekombinant hergestellte IL-8 wurde zunächst charakterisiert und seine chemotaktische Aktivität auf neutrophile Granulozyten untersucht, um seine biologische Funktion zu überprüfen. Es wurde weiterhin eine <sup>15</sup>N-markierte Variante des IL-8 rekombinant hergestellt, um NMR-Studien mit Bindungspartnern durchführen zu können.

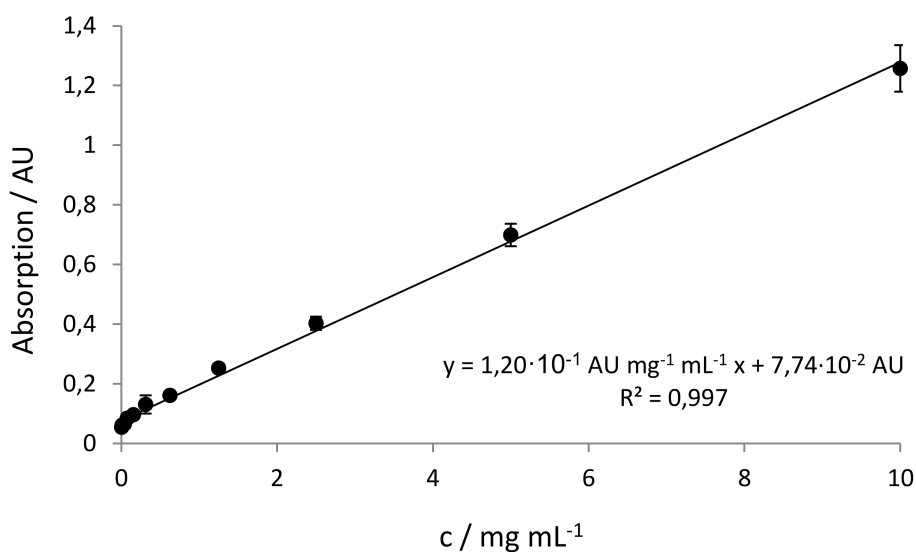
#### Faltung von Interleukin-8

Die richtige Faltung spielt für die Funktion der Chemokine eine wichtige Rolle und kann bei der rekombinanten Herstellung problematisch sein. CXC-Chemokine besitzen vier Cysteine, die falsch oder nur teilweise verknüpft werden können, woraus eine falsche Faltung des Proteins resultiert. Durch Verwendung des pET22b-Expressionsvektors wird das Protein mit einer pelB-Signalsequenz exprimiert, durch die es unter Abspaltung der Sequenz in das Periplasma transportiert wird. Dort herrschen oxidierende Bedingungen, in denen sich die Disulfidbrücken leichter ausbilden können. Die korrekte Faltung des in unseren Laboren rekombinant hergestellten IL-8 wurde bereits in Kooperation mit Dr. Dorothea Helmer durch Circular dichroismus-Spektroskopie nachgewiesen.<sup>[212,218]</sup>

#### Konzentration von Interleukin-8

Weiterhin stellt die exakte Konzentrationsbestimmung des Chemokins für Bindungs- und Aktivitätsassays einen sehr wichtigen und kritischen Faktor dar. Bislang wurde die Konzentration der IL-8 Lösungen mittels BCA-Assay durchgeführt, wobei Lysozym zur Erstellung einer Kalibriergerade verwendet wurde. Beim BCA-Assay wird  $\text{Cu}^{2+}$  von Peptidbindungen quantitativ zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, das mit Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex bildet, der photometrisch bei 562 nm quantifizierbar ist.<sup>[219]</sup> Die Reduktion wird durch Aminosäurereste wie Cystein, Tryptophan und Tyrosin beeinflusst, sodass die Wahl eines ungeeigneten Proteins zur Erstellung einer Kalibriergerade die Bestimmung verfälschen kann. Da Chemokine Cysteine, Tryptophane und Tyrosine beinhalten, war die Bestimmung mittels BCA-Assay mit Lysozym als Standard sehr ungenau. Während IL-8 nur 5,6 Cysteine, 1,4 Tryptophane und 1,4 Tyrosine jeweils pro 100 Aminosäuren aufweist, besitzt Lysozym 6,2 Cysteine, 4,7 Tryptophane und 2,3 Tyrosine pro 100 Aminosäuren. Das Verhältnis dieser entscheidenden

Aminosäuren ist demnach sehr unterschiedlich. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsbestimmung über die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm als alternativer Ansatz gewählt. Dazu wurde zunächst eine Kalibriergerade für IL-8 erstellt. Laut dem Lambert Beer'schen Gesetz ist die Absorption einer verdünnten Lösung proportional zur Konzentration und Schichtdicke. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurde eine große Menge rekombinant hergestelltes IL-8 (ca. 30 mg) komplett entsalzt und gefriergetrocknet, um anschließend gravimetrisch die Masse bestimmen zu können. Es wurde eine exakte Stammlösung von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  hergestellt, mit welcher eine Kalibriergerade durch Messung der Absorption bei 280 nm für verschiedene Verdünnungen erstellt wurde. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal durchgeführt und es wurde ein Mittelwert aus den drei unabhängigen Experimenten gebildet, um eine möglichst genaue Bestimmung der Konzentration sicherzustellen (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1:** Kalibriergerade zur Bestimmung der IL-8 Konzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Die Messung erfolgte in einem Volumen von jeweils  $18 \mu\text{L}$  in Puffer C in einer UV-transparenten 384er Mikrotiterplatte (Corning). Kalibriergerade erstellt aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Die Kalibriergerade zeigt mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,997 einen sehr genauen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Absorption bei 280 nm in dem gewählten Konzentrationsbereich von  $0,01 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Die Standardabweichungen sind sehr klein, was für die Genauigkeit dieser Art der Bestimmung der Konzentration spricht. Bei einer Konzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  ist ein höherer Wert für die Standardabweichung zu beobachten, was auf die Änderung des Meniskus durch die erhöhte Viskosität der Lösung hindeutet. Die zu bestimmenden Konzentrationen sollten dementsprechend unter  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  liegen, um den Fehler der Bestimmung zu minimieren. Es ist zu beachten, dass die Absorption nur bei konstanter Schichtdicke proportional zur Konzentration der Lösung ist (Lambert Beer'sches Gesetz). Somit ist für jede Bestimmung das gleiche experimentelle Setup zu wählen und die abgebildete Kurve kann nur verwendet werden, wenn die Absorptionsmessung in dem gleichen Volumen in der gleichen Mikrotiterplatte erfolgt. Auch ist für jede weitere Bestimmung der gleiche Puffer zu verwenden, da die Salzkonzentration und die Viskosität der Lösung ebenfalls einen Einfluss auf die Schichtdicke und somit auf die Absorption haben können.

Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung der IL-8 Stammlösung mit dem BCA-Assay durchgeführt, um den bislang getätigten Fehler dieses Verfahrens abschätzen zu können. Dazu wurden zwei bekannte IL-8 Konzentrationen aus der Stammlösung (gravimetrisch bestimmte Masse von IL-8) hergestellt und im BCA-Assay unter Verwendung von Lysozym zur Erstellung der Kalibriergerade untersucht (Tabelle 5.1).

**Tabelle 5.1:** Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung einer bekannten IL-8 Konzentration mittels BCA-Assay unter Verwendung von Lysozym zur Erstellung der Kalibriergerade.

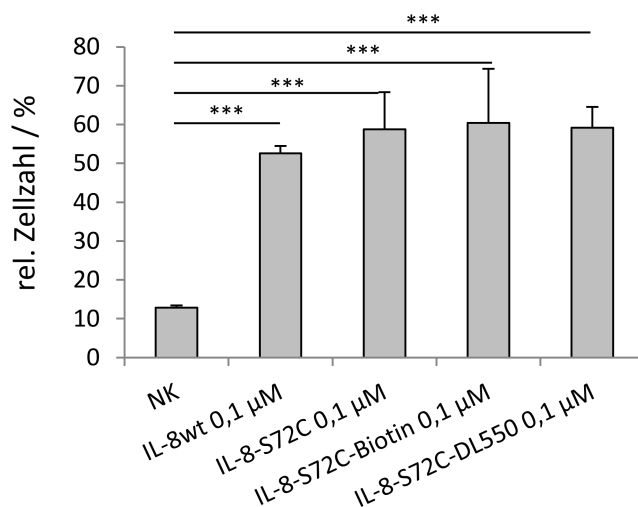
$c_{\text{eingesetzt}} / \text{mg mL}^{-1}$	$c_{\text{ermittelt}} / \text{mg mL}^{-1}$	Abweichung / %
1,25	0,23	81,6
0,31	0,06	80,7

Die eingesetzten Konzentrationen an IL-8 konnten nicht näherungsweise mit dem BCA-Assay bestimmt werden. Bei beiden Konzentrationen war eine Abweichung von über 80 % zu beobachten und der ermittelte Wert entspricht nur ca. einem Fünftel der tatsächlichen Konzentration. Die Abweichung von 80 % war jedoch nicht reproduzierbar und zeigte in Folgeversuchen starke Schwankungen. Dieses Ergebnis zeigte, dass es dringend erforderlich war, die Proteinkonzentrationsbestimmung zu optimieren. Daher wurde ab diesem Zeitpunkt mithilfe der IL-8 Kalibriergerade die Konzentration aller IL-8 Lösungen über die Absorption bei 280 nm bestimmt.

### Aktivität von Interleukin-8

Zur Entwicklung von Aktivitäts- und Migrationsassays war die chemotaktische Aktivität des Wildtyp IL-8 sowie der Mutante IL-8-S72C zu überprüfen. Die Mutante IL-8-S72C besitzt C-terminal ein Cystein statt einem Serin, dass für Konjugationen verwendet werden kann. Zum einen wurde ein Biotinmolekül in einer Michael-Addition über ein Maleimid an das Cystein gekuppelt und zum anderen wurden ebenfalls in einer Michael-Addition maleimidfunktionalisierte Fluorophore wie z.B. Fluorescein oder DyLight® 550 (DL550) konjugiert. Diese Konjugationen können die Aktivität der Chemokine auf Zellen beeinflussen, die es daher zu überprüfen galt. Dazu wurde ein Transwellassay mit neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Dieser beruht auf dem Prinzip der Boyden-Kammer<sup>[173]</sup> und bestimmt semi-quantitativ die Anzahl an migrierten Zellen in Richtung eines Chemoattraktantgradienten. Im Transwellsystem, das aus zwei Kammern besteht, wird in die obere Kammer eine Zellsuspension und in die untere der Chemoattraktant gegeben. Die beiden Kammern sind über eine mikroporöse Membran voneinander getrennt, über die sich der Gradient ausbildet. Die Zellzahl der in die untere Kammer gewanderten Zellen kann fluorimetrisch durch Calcein-Färbung der Zellen oder durch Auszählung bestimmt werden. Die Ergebnisse des Transwellassays mit den verschiedenen IL-8 Varianten sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Sowohl für den Wildtyp als auch für die getesteten IL-8 Konjugate konnte eine chemotaktische Aktivität nachgewiesen werden. Der Anteil der unspezifisch migrierten Zellen der Negativkontrolle war mit nur ca. 10 % gering und unterschied sich hoch signifikant von den getesteten Chemokinvarianten mit über 50 bis 60 % Zellmigration. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zeigten alle Varianten in etwa die gleiche chemotaktische Aktivität wie der Wildtyp, sodass die C-terminale Modifikation und Konjugation des Chemokins

keinen Einfluss auf dessen Funktion nimmt und die Konjugate in weiteren Versuchen wie IL-8 wt verwendet werden konnten.

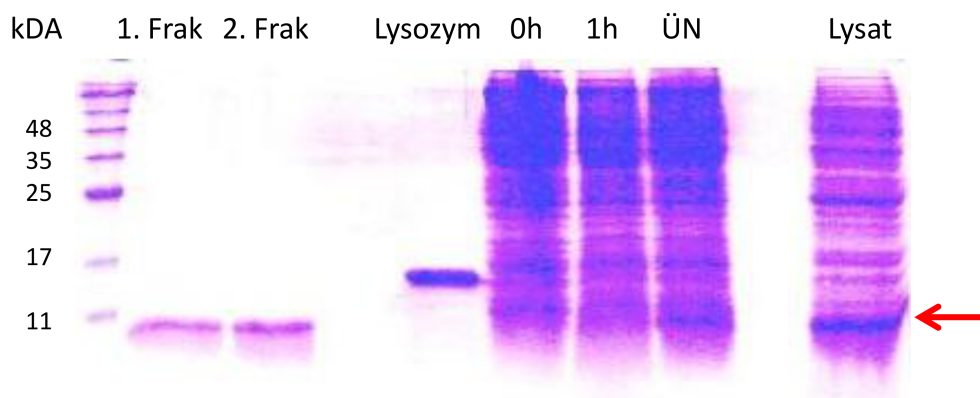


**Abbildung 5.2:** Transwellassay zur Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten nach IL-8 und verschiedenen IL-8 Derivaten. Die Zellzahl wurde über die Fluoreszenzintensität von Calcein-AM ( $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ ) bestimmt. Die Anzahl an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis von migrierten Zellen zur absoluten Zellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

### Optimierung der Expression von $^{15}\text{N}$ -Interleukin-8 für NMR-Studien

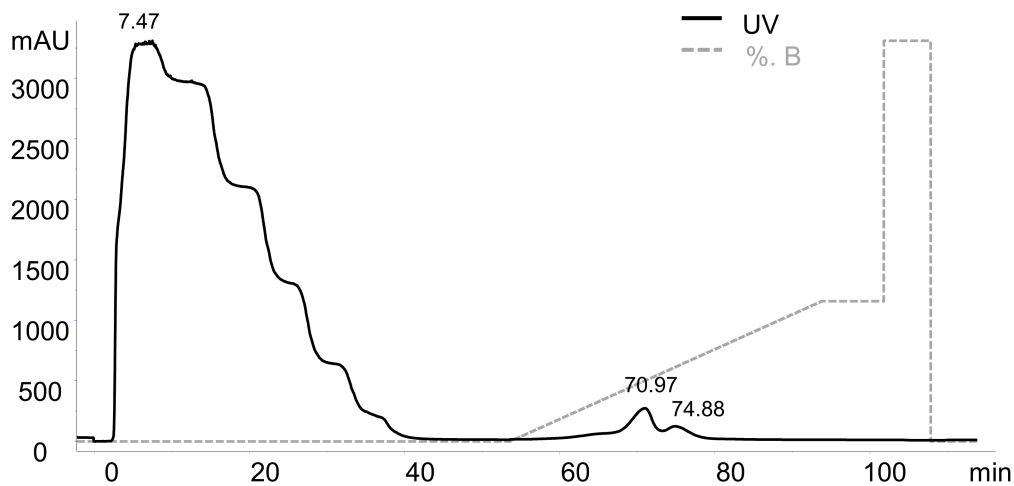
Für NMR-Untersuchungen von Komplexen des Chemokins mit möglichen Bindungspartnern sollte weiterhin eine isotopenmarkierte IL-8 Variante rekombinant hergestellt werden. Dazu wurde das gleiche Expressionssystem wie bei der Herstellung des IL-8 wt verwendet. Jedoch wurde die Expression in *E. coli* nicht in LB-Medium, sondern in dem Minimalmedium M9 durchgeführt, das als einzige Stickstoffquelle  $^{15}\text{N}$ -markiertes Ammoniumchlorid enthält.<sup>[220]</sup> Vorversuche zur Expressionsoptimierung wurden mit unmarkiertem Ammoniumchlorid durchgeführt. Anfänglich wurden die Zellen direkt in Minimalmedium herangezogen, doch das Wachstum war aufgrund der fehlenden Nährstoffquellen sehr langsam. Aus diesem Grund wurde die Anzucht der Bakterien bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte in LB-Medium durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in M9-Medium überführt und für weitere 2 h inkubiert, bevor die Expression induziert wurde. Diese Prozedur führte zu einer Überexpression von IL-8 in *E. coli*, was anhand einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft wurde (Abbildung 5.3). Zum Zeitpunkt der Induktion konnte keine Hintergrundexpression von IL-8 beobachtet werden. Auch nach einer einstündigen Expression war keine entsprechende Bande für IL-8 sichtbar. Es musste erst eine Umstellung des Stoffwechsels auf das Minimalmedium erfolgen, bevor die Bakterien anfangen, ein Protein zu exprimieren. Nach Übernachtexpression konnte das Protein eindeutig in der SDS-PAGE identifiziert werden (Abbildung 5.3). Die Expression in Minimalmedium war somit erfolgreich, auch wenn die Expressionsdauer im Vergleich zu 3 h bei IL-8 wt deutlich verlängert werden musste. Dies ist jedoch auch ein erwünschter Effekt, da die Zeitverzögerung darauf hindeutet, dass die Zellen bei der langsameren Expression zunächst neue,

markierte Aminoacyl-tRNAs herstellen und weniger der unmarkierten, noch in der Zelle vorhandenen tRNA für die Synthese von IL-8 verwendet wird. Der Zellaufschluss erfolgte analog zu IL-8 wt und anhand der SDS-PAGE konnte das Protein eindeutig im Zelllysate nachgewiesen werden. Es wurde ein Hitzeschritt bei 70 °C zur Denaturierung des Lysozyms, das zum Zellaufschluss verwendet wurde, und weiteren bakteriellen Proteinen im Zelllysate durchgeführt. IL-8 ist in diesem Temperaturbereich stabil.<sup>[221]</sup> Daher wurde zusätzlich Lysozym auf die SDS-PAGE aufgetragen, um Verunreinigungen mit diesem Protein identifizieren zu können. Da es nur noch schwach im Zelllysate nachweisbar war, war der Hitzeschritt erfolgreich.

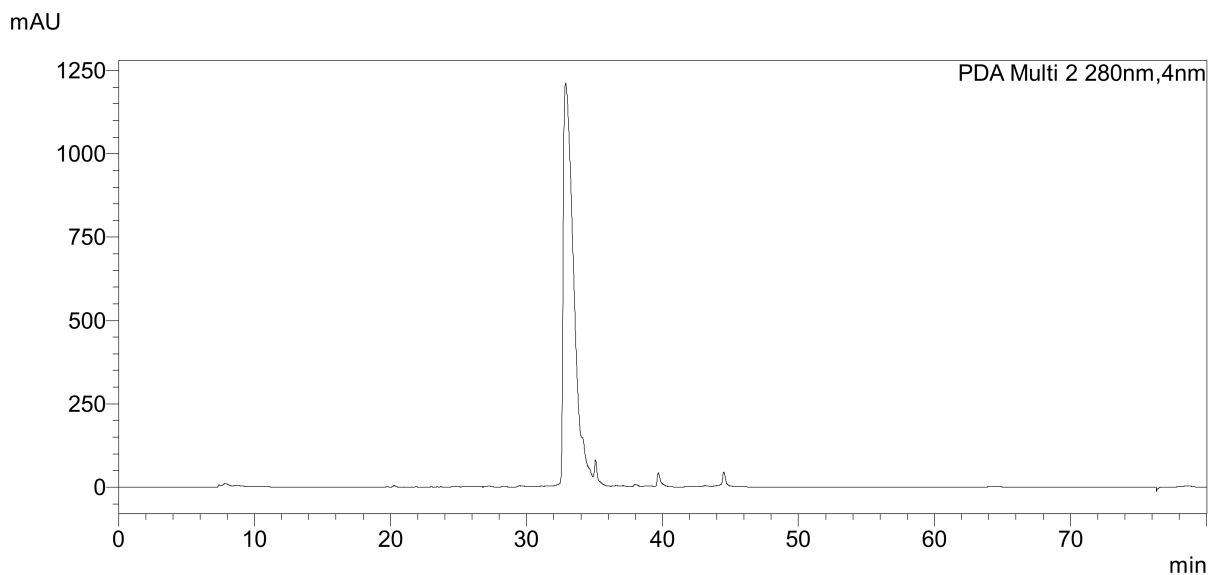


**Abbildung 5.3:** SDS-PAGE zur Expressions- und Reinigungskontrolle für rekombinant hergestelltes <sup>15</sup>N-markiertes IL-8. Aufgetragen sind beide Fraktionen aus der Kationenaustauschchromatographie, Lysozym, der Expressionsverlauf nach 0 und 1 h sowie über Nacht und das Zelllysate. Der rote Pfeil gibt die Laufhöhe des IL-8 bei ca. 8 kDa an.

Die Reinigung von <sup>15</sup>N-IL-8 aus dem Zelllysate erfolgte aufgrund des hohen pI analog zu IL-8 wt über einen Kationenaustauscher (Abbildung 5.4). Das Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie zeigt bei 7,5 min die Elution aller nicht bindenden und somit neutralen oder negativ geladenen Proteine. Bei einer Chloridionenkonzentration zwischen 145 und 265 mM wurden zwei Peaks identifiziert: einer nach 71 und einer nach 75 min. Beide Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE analysiert (Abbildung 5.3) und aufgrund des Molekulargewichts als IL-8 identifiziert. Auch zeigte die PAGE eine sehr hohe Reinheit für beide Fraktionen, da keine anderen Banden sichtbar waren. Das restliche Lysozym des Zelllysats konnte trotz ähnlichem pI des Lysozyms zu dem des IL-8 über den Kationenaustauscher abgetrennt werden. Die beiden IL-8 Fraktionen wurden vereinigt und nach dem Entsalzen über eine *reversed phase* Chromatographie analog zu IL-8 wt weiter gereinigt (Abbildung 5.5). Nach 33 min wurde ein scharfer Peak beobachtet, der die optimale Reinigung durch den Kationenaustauscher bestätigte. Es waren keine weiteren Verunreinigungen sichtbar. Die gravimetrische Bestimmung ergab, dass aus einem 1 L Expressionsansatz 6,6 mg <sup>15</sup>N-markiertes IL-8 isoliert wurden. Das Protein wurde somit in guter Ausbeute exprimiert und gereinigt.



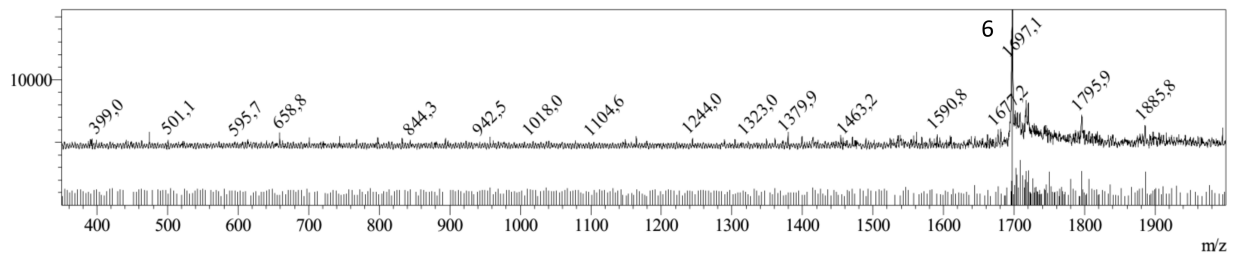
**Abbildung 5.4:** Chromatogramm des Kationenaustauschers zur Reinigung des Zelllysats von rekombinant hergestelltem  $^{15}\text{N}$ -IL-8. Dargestellt sind die UV-Absorption bei 280 nm (schwarz) und der Verlauf des Puffer B Gradienten (grau gestrichelt). Die Injektion des Zelllysats erfolgte zum Zeitpunkt 0 min.



**Abbildung 5.5:** Chromatogramm der *reversed phase* Chromatographie zur Reinigung des entsalzten  $^{15}\text{N}$ -IL-8. Dargestellt ist die UV-Absorption bei 280 nm mit einer Bandbreite von 4 nm.

Zur Überprüfung der Masse des exprimierten Proteins wurde eine LC-MS durchgeführt, die hauptsächlich einen Peak von einem Masse/Ladungsverhältnis von 1697,1 aufwies (Abbildung 5.6). Dies entspricht einer Masse von 8486 Da. Natives IL-8 besitzt eine Masse von 8383 Da, die jedoch durch den Einbau des Isotops  $^{15}\text{N}$  größer sein sollte. IL-8 besitzt 72 Stickstoffatome im Rückgrat und 34 in den Aminosäureseitenketten, somit insgesamt 106 Stickstoffatome. Die Masse von  $^{15}\text{N}$ -markiertem IL-8 kann also bei vollständigem Einbau von  $^{15}\text{N}$  maximal 8489 Da betragen. Die ermittelte Masse von 8486 Da zeigte mit 97 % nahezu vollständigen Einbau an und somit wurden offenbar die unmarkierten Aminoacyl-tRNAs, die durch das Heranwachsen in LB-Medium noch in der Zelle vorhanden

waren, zunächst für den Aufbau von Proteinen der neuen Stoffwechselwege verbraucht, bevor das rekombinante Protein hergestellt wurde.



**Abbildung 5.6:** Massenspektrum der LC-MS des  $^{15}\text{N}$ -markierten IL-8 nach Reinigung über einen Kationenaustauscher und eine *reversed phase* Chromatographie.

### 5.1.2 Chemotaktische Reaktionen von Endothel- und Epithelzellen auf Interleukin-8

Neutrophile Granulozyten sind in ihrer Handhabung sehr schwierig, da sie aufwendig isoliert werden müssen und dabei schnell ohne Zusatz entsprechender Chemoattraktanten allein durch mechanische Stimulation aktiviert werden. Außerdem sind donorabhängige Unterschiede gegeben, wodurch die Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet ist. Aus diesem Grund wurde nach einem alternativen, robusteren Zellsystem gesucht. HL-60 ist eine promyeloblastische Zelllinie<sup>[222]</sup>, die mit entsprechenden Reagenzien zu Granulozyten differenziert werden kann.<sup>[223]</sup> Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit für diese Zelllinie trotz in der Literatur beschriebener Chemotaxis nach IL-8<sup>[224,225]</sup> diese nicht im Transwellassay nachgewiesen werden. Da keine migratorische Neutrophilenzelllinie existiert, wurde nach einem anderen Zelltyp gesucht. Der Einfluss von IL-8 auf Endothelzellen in z.B. der Angiogenese und der embryonalen Entwicklung wurde bereits im Kapitel 2.2 erläutert. Es war daher naheliegend, zur Verfügung stehende Endothelzellen auf ihre migratorische Antwort hin zu untersuchen. Weiterhin wurde die Epithelzelllinie HEK293 mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1 stabil transfiziert<sup>a</sup> und es wurde auch eine solche Zelllinie mit CXCR1/EGFP erhalten<sup>b</sup>. Diese Zellen sollten wegen der Expression des entsprechenden GPCRs CXCR1 ebenfalls in der Lage sein, durch IL-8 induzierte Chemotaxis zu zeigen.

#### Optimierung des Transwellassays für adhärente Zellen mit HEK293-CXCR1 und Untersuchungen des chemotaktischen Einflusses von IL-8

Zur Untersuchung der Chemotaxis verschiedener Endothel- und Epithelzellen wurde zunächst das Transwellsystem, das in dieser Arbeit bisher ausschließlich für neutrophile Granulozyten und somit für Suspensionszellen angewandt wurde, auf adhärente Zellen übertragen. Dabei war zu beachten, dass adhärente Zellen deutlich größer als Neutrophile mit nur  $10\mu\text{m}$  sind, sodass Membranen mit Poren von  $8\mu\text{m}$  anstatt  $3\mu\text{m}$  benötigt wurden. Weiterhin weisen diese Zellen eine deutlich geringere Migrationsgeschwindigkeit auf, weshalb längere Inkubationszeiten zu wählen waren. In Anlehnung an Protokolle von Montuori *et al.*<sup>[226]</sup> und Kim *et al.*<sup>[227]</sup>, die ebenfalls den Transwellassay mit HEK293-

<sup>a</sup> Die Transfektion wurde von Dipl.-Chem. Marina Jöst durchgeführt.

<sup>b</sup> Von Jean-Luc Galzi, Ph.D., Straßburg, zur Verfügung gestellt.

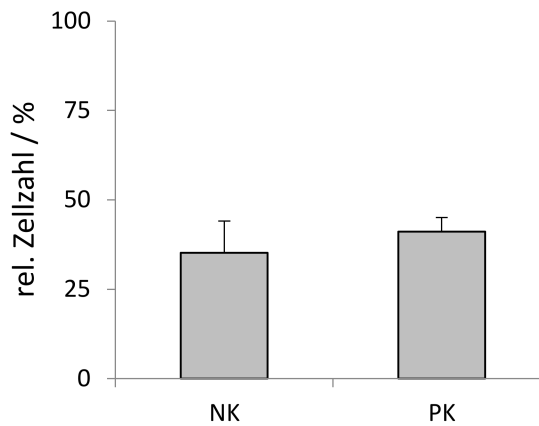
Zellen durchgeführt bzw. die Zellviabilität mit Resazurin überprüft haben, wurde der erste Versuch mit den in Tabelle 5.2 aufgeführten Parametern durchgeführt. Als IL-8 Konzentration wurde analog zum Transwellassay mit neutrophilen Granulozyten  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  gewählt. Die Inkubationszeit im Transwellssystem wurde auf 4 h verlängert, bevor die Zellen aus der oberen Kammer entfernt und Resazurin in die untere Kammer gegeben wurde, um die Zelldichte dort zu quantifizieren. Alle an die Membran adhären Zellen können somit das Resazurin umsetzen. Dabei kann es sich um unspezifisch adhären Zellen an der Oberseite der Membran oder um spezifisch nach IL-8 durch die Membran migrierte Zellen, die nun an der unteren Seite der Membran adhären sind, handeln. Aus diesem Grund ist hier eine Negativkontrolle ohne IL-8 sehr wichtig, um das unspezifische Adhäsionsverhalten der HEK293-Zellen an der Membran zu erfassen.

**Tabelle 5.2:** Gewählte Parameter für den Transwellassay mit HEK293-CXCR1 und IL-8.

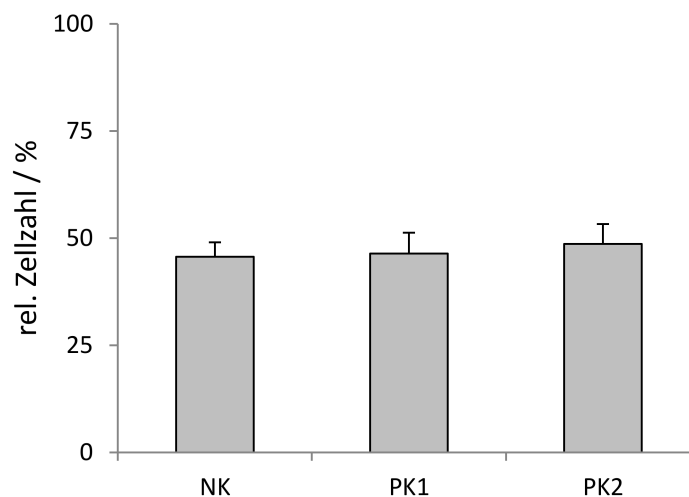
Parameter	Wert
$t_{\text{Inkubation}}(\text{IL-8})$	4 h
$t_{\text{Inkubation}}(\text{Resazurin})$	3 h
$c(\text{IL-8})$	$100 \text{ ng mL}^{-1}$
$c(\text{Resazurin})$	$1 \mu\text{M}$

Zum Nachweis der migrierten Zellen wurde nicht wie im Transwellassay mit Neutrophilen Calcein-AM sondern Resazurin verwendet. Da adhären Zellen nur an die Unterseite der Membran wandern und nicht in die darunterliegende Kammer hinein, kann die Zellzahl nicht direkt durch Zellfärbung bestimmt werden, sondern über einen Zellviabilitätsnachweis, bei dem die Zellen eine detektierbare Substanz im Medium umsetzen. Resazurin ist ein blauer, nicht fluoreszenter Farbstoff, der sowohl von Bakterien und Hefen als auch von Säugerzellen zu dem intensiv rotviolett, stark fluoreszenten Resorufin reduziert werden kann. In einer zweiten, reversiblen Reduktion kann Resorufin zu dem farblosen, nicht fluoreszenten Dihydroresorufin reduziert werden.<sup>[228,229]</sup> Die Fluoreszenzintensität des entstehenden Resorufins ist proportional zur Zellzahl und kann somit zur relativen Zellzahlbestimmung verwendet werden. In Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse des ersten Transwellassays mit HEK293-CXCR1 und IL-8 dargestellt. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle zu beobachten, wobei die Positivkontrolle mit über 40 % der Gesamtzellzahl eine etwas höhere Zellzahl als die Negativkontrolle mit 35 % aufwies. Aufgrund der adhäsiven Eigenschaften der HEK-Zellen war offenbar eine hohe Zahl an unspezifisch adhären Zellen an der Membranoberseite in der Negativkontrolle ohne IL-8 vorhanden, wodurch keine großen Unterschiede zur Probe mit den migrierenden Zellen beobachtet werden konnten. Aus diesem Grund wurde die Inkubation der Zellen im Transwellassay mit IL-8 von 4 auf 1 h reduziert, um so die unspezifische Adhäsion der Zellen an die Membran möglichst zu verringern. Zusätzlich wurde eine zweite IL-8 Konzentration von  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  hinzugenommen, um sicherzustellen, dass eine geeignete IL-8 Konzentration verwendet wurde (Abbildung 5.8).





**Abbildung 5.7:** Transwellassay mit HEK293-CXCR1 und IL-8 nach den in Tabelle 5.2 aufgeführten Parametern. Die Zahl der migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK entspricht  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon C11.



**Abbildung 5.8:** Transwellassay mit HEK293-CXCR1 und IL-8 nach den in Tabelle 5.2 aufgeführten Parametern, jedoch verkürzter Inkubationszeit mit IL-8 von 1 h. Die Zahl an migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK1 entspricht  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  und PK2  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon C11.

Auch in diesem Versuch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Negativ- und den beiden Positivkontrollen zu beobachten. Die unspezifische Bindung der Zellen an die Oberseite der Membran konnte durch Verkürzen der Inkubationszeit nicht verringert werden. Im Gegenteil, mit 45 % der Gesamtzellzahl schienen noch mehr Zellen an der Membran zu adhären. Der fehlende Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle konnte somit nicht auf die Inkubationszeit der Zellen mit der Membran bzw. mit IL-8 zurückgeführt werden. Es lag die Vermutung nahe, dass die

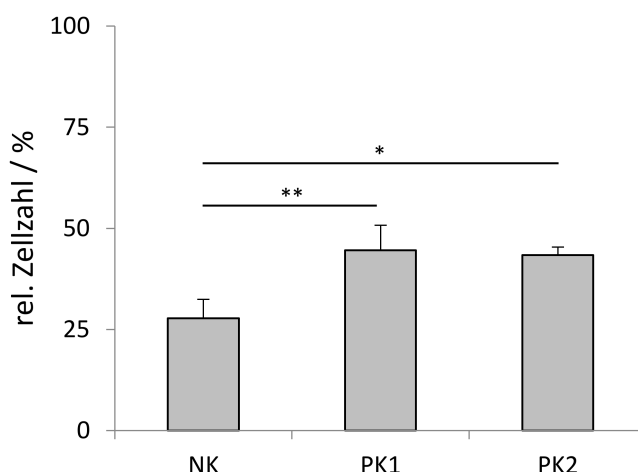


erkennen. Da jedoch die am Reader eingestellte Verstärkung zur besseren Auflösung bei der Messung des Transwellassays deutlich größer war, konnte in diesem Fall ein Unterschied detektiert werden. Aus diesem Grund wurde die Resazurinkonzentration für weitere Versuche auf  $40\text{ }\mu\text{M}$  erhöht, da für diesen Wert abhängig von der bei der Messung verwendeten Verstärkung von 90 der größte dynamische Bereich erhalten wurde. Bei dieser Konzentration können Zellzahlunterschiede zwischen 6000 und 12000 Zellen noch signifikant voneinander unterschieden werden.

Die Parameter wurden angepasst (Tabelle 5.3) und der Transwellassay wurde unter diesen Bedingungen wiederholt (Abbildung 5.10).

**Tabelle 5.3:** Optimierte Parameter für den Transwellassay mit HEK293-CXCR1.

Parameter	Wert
$t_{\text{Inkubation}}(\text{IL-8})$	4 h
$t_{\text{Inkubation}}(\text{Resazurin})$	3 h
$c(\text{IL-8})$	10 (PK1) bzw. $100\text{ ng mL}^{-1}$ (PK2)
$c(\text{Resazurin})$	$40\text{ }\mu\text{M}$

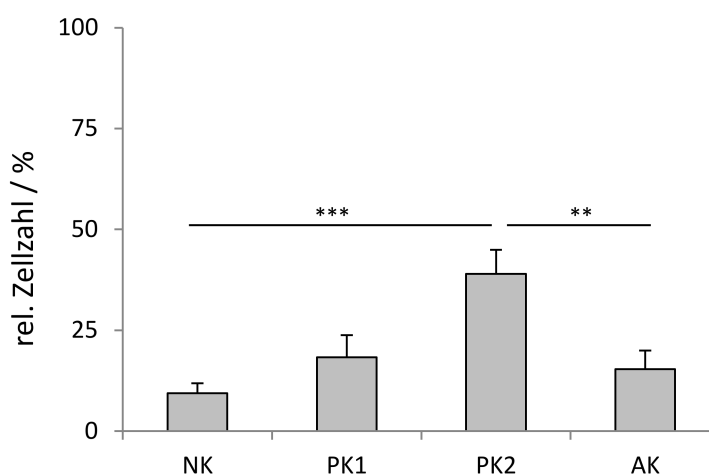


**Abbildung 5.10:** Transwellassay mit HEK293-CXCR1 und IL-8 nach den in Tabelle 5.3 aufgeführten Parametern. Die Zahl der migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585\text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK1 entspricht 10 und PK2  $100\text{ ng mL}^{-1}$  IL-8. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon C11. Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

Es war erstmals ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativ- und den beiden Positivkontrollen sichtbar. Dabei war der Wert der Negativkontrolle mit weniger 30 % geringer als in den vorangegangenen Versuchen. Es konnte keine Konzentrationsabhängigkeit der Chemotaxis festgestellt werden, da beide IL-8 Konzentrationen in etwa gleiche Zellzahlen aufwiesen. Mit fast 45 % des Signals war jedoch ein signifikanter Unterschied der Migration der HEK293-CXCR1 im Vergleich zur Negativkontrolle gegeben. Es schien tatsächlich, dass die Resazurinkonzentration von  $1\text{ }\mu\text{M}$  nicht

ausreichend war, um die Zellzahlunterschiede nachzuweisen. Auch die extrem hohen Zellzahlen von 35 - 40 % in der Negativkontrolle könnten darauf zurückzuführen sein. Beim Transwellassay mit Neutrophilen konnten ähnliche Beobachtungen der großen Schwankungen der Zellzahl in der Negativkontrolle gemacht werden. Diese Schwankungen scheinen in Migrationsassays dieser Art üblich zu sein. Kritisch ist bei dieser Art der Durchführung auch die Unterscheidung von unspezifisch adhären Zellen an der Oberseite der Membran und nach IL-8 migrierten Zellen, die an der Unterseite der Membran adhären sind. Die Umsetzung von Resazurin im Medium erlaubt eine Bestimmung der Gesamtdichte der an der Membran adhären Zellen unabhängig von dem Ort der Adhäsion.

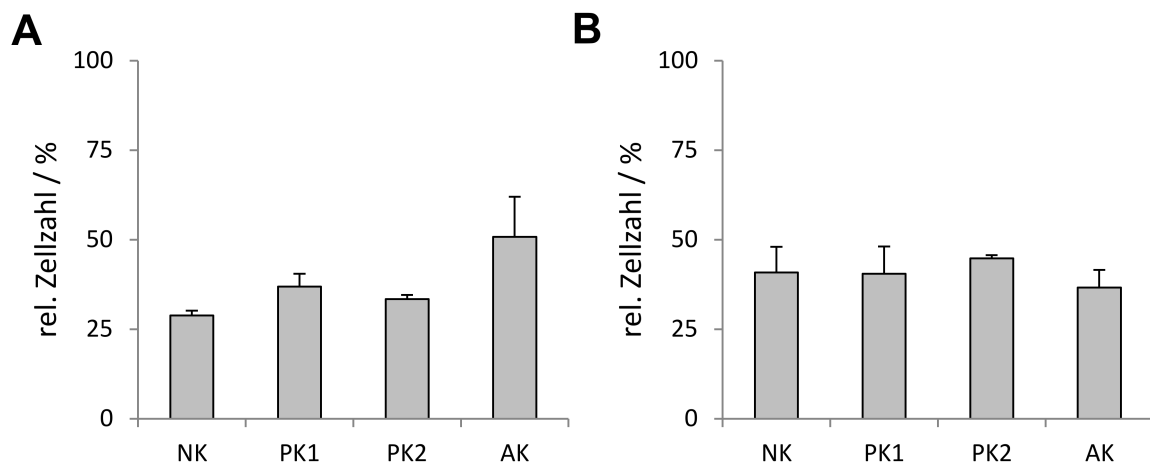
Im nächsten Versuch wurde ein anti-IL-8 Antikörper eingesetzt, um zu überprüfen, ob die verstärkte Migration in der Positivkontrolle spezifisch durch IL-8 hervorgerufen wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.11 dargestellt.



**Abbildung 5.11:** Transwellassay mit HEK293-CXCR1 und IL-8 nach den in Tabelle 5.3 aufgeführten Parametern und anti-IL-8 Antikörperkontrolle. Die Zahl der migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK1 entspricht 10 und PK2 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8, AK steht für die anti-IL-8 Antikörperkontrolle mit 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8 und 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Antikörper. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon B8. Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

In diesem Fall war kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativ- und der Positivkontrolle 1 mit 10  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8 (PK1) vorhanden. Der Unterschied in der Zellzahl der Negativkontrolle zur Positivkontrolle 2 mit 100  $\text{ng mL}^{-1}$  war hingegen mit 40 % migrierten Zellen um so größer und hoch signifikant. Die Negativkontrolle war in diesem Versuch mit ca. 10 % sehr niedrig im Vergleich zu den vorherigen Versuchen. Der Antikörper gegen IL-8 zeigte mit 15 % Zellmigration eine deutliche Inhibierung der Migration bei 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8, die statistisch signifikant ist. Der Wert ist mit 15 % der Zelldichte ähnlich dem Wert der Positivkontrolle 1 und nur leicht erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle. Somit konnte die durch 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8 induzierte Chemotaxis nahezu vollständig inhibiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die HEK293-CXCR1 Zellen in der Lage sind, nach IL-8 zu migrieren und diese Chemotaxis durch Bindung des IL-8 mit einem Antikörper inhibiert werden kann. Es handelt sich jedoch nur um semi-quantitative Ergebnisse, da eine quantitative Aussage unter

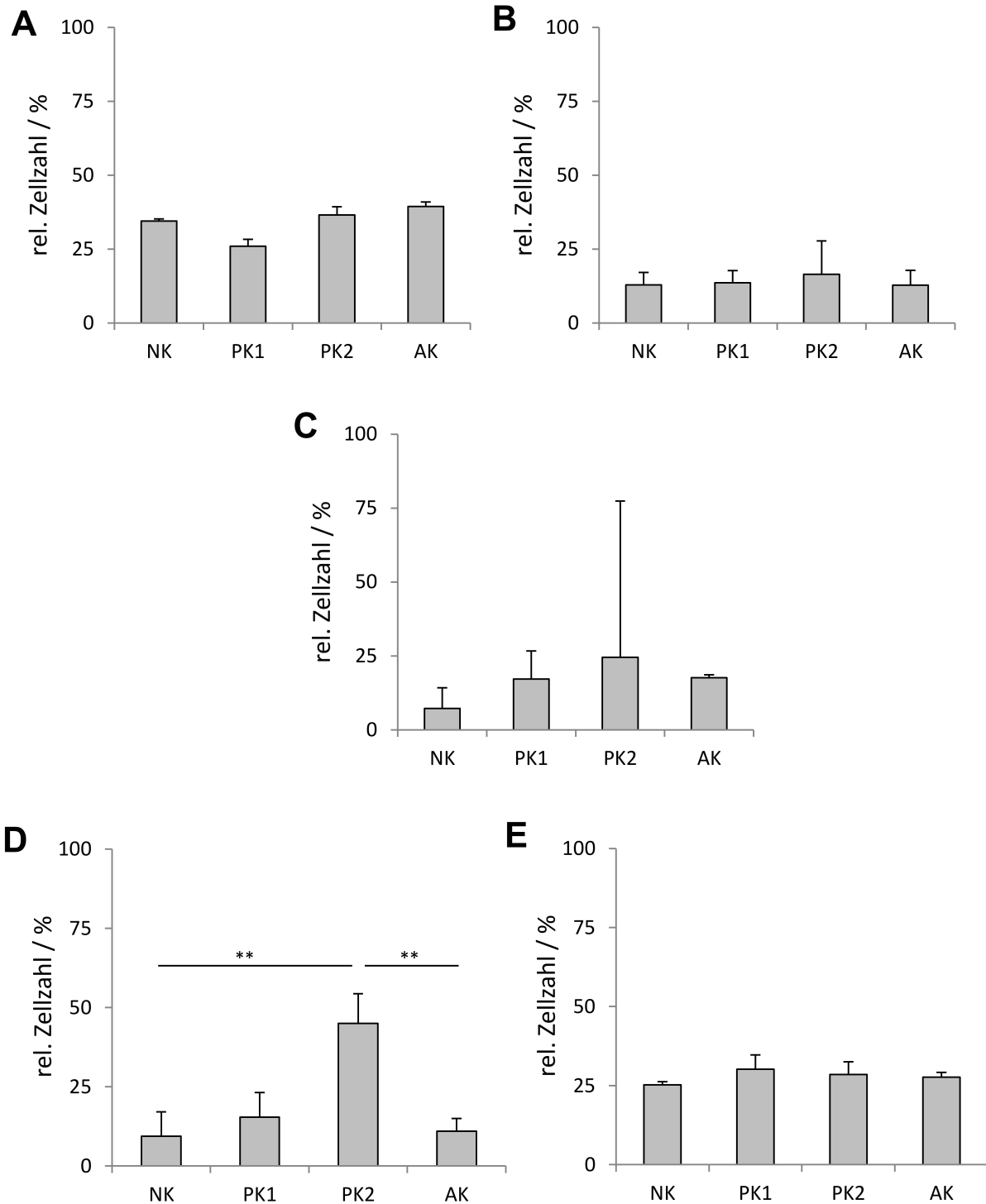
Verwendung des Transwellassays aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit nicht möglich ist. In Abbildung 5.12 sind Wiederholungen der Versuche, mit den gleichen Parametern wie in Tabelle 5.3 aufgeführt, dargestellt.



**Abbildung 5.12:** Wiederholungen des Transwellassays mit HEK293-CXCR1 und IL-8 nach den in Tabelle 5.3 aufgeführten Parametern und mit anti-IL-8 Antikörperkontrolle. Die Zahl der migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. A und B zeigen zwei unabhängige Versuche mit den gleichen Bedingungen wie die Ergebnisse aus Abbildung 5.11. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK1 entspricht 10 und PK2 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8, AK steht für die anti-IL-8 Antikörperkontrolle mit 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8 und 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Antikörper. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon C11.

Beide Versuche bestätigten, dass sowohl die Chemotaxis nach IL-8 als auch die Inhibierung mittels anti-IL-8 Antikörper schlecht reproduzierbar waren. Die Werte der Zellzahlen in Negativ-, Positiv- und Antikörperkontrollen waren in etwa alle gleich und es konnte keine Chemotaxis nach IL-8 beobachtet werden. Auch waren in diesen Versuchen erneut die Negativkontrollen mit 30 und 40 % sehr hoch. Es schien somit einen Zusammenhang zwischen einer hohen unspezifischen Adhäsion der Zellen an der Membran und der Migration nach IL-8 zu geben. Bei jedem Versuch, in dem die Negativkontrolle eine sehr hohe Zellzahl aufwies, konnte keine IL-8 induzierte Chemotaxis beobachtet werden bzw. war die Negativkontrolle vermutlich zu groß, um Unterschiede zu detektieren. Die HEK293-CXCR1-Zellen sind zwar prinzipiell in der Lage, nach IL-8 zu migrieren, jedoch scheint die Antwort sehr schwach zu sein, der gewählte Transwellassay stellt ein ungeeignetes System zur Messung der Chemotaxis dar oder die Art der Auswertung ist wenig sensitiv. Da die adhären Zellen auf jeder ihnen zur Verfügung stehenden Fläche adhären und besonders gern auf porösen Flächen wie einer Membran, ist die Negativkontrolle durch die Nichtunterscheidbarkeit von Ober- und Unterseite der Membran vermutlich das Problem bei dieser Durchführung und es sollte zusätzlich ein weiterer Migrationsassay getestet werden.

Um zu zeigen, dass die durch IL-8 ausgelöste Chemotaxis nur nach Transfektion der HEK293-Zellen mit dem GPCR CXCR1 möglich ist und die Zellen *per se* nicht nach IL-8 migrieren, wurden Transwellassays mit Wildtyp HEK293 durchgeführt (Abbildung 5.13A, B, C).



**Abbildung 5.13:** Transwellassay mit Wildtyp HEK293 bzw. HEK293-CXCR1/EGFP und IL-8 nach den in Tabelle 5.3 aufgeführten Parametern und mit anti-IL-8 Antikörperkontrolle. Die Zahl der migrierten Zellen wurde über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). PK1 entspricht 10 und PK2 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8, AK steht für die anti-IL-8 Antikörperkontrolle mit 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8 und 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Antikörper. Verwendete Zelllinie: A, B, C: Wildtyp HEK293; D, E: HEK293-CXCR1/EGFP. Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

---

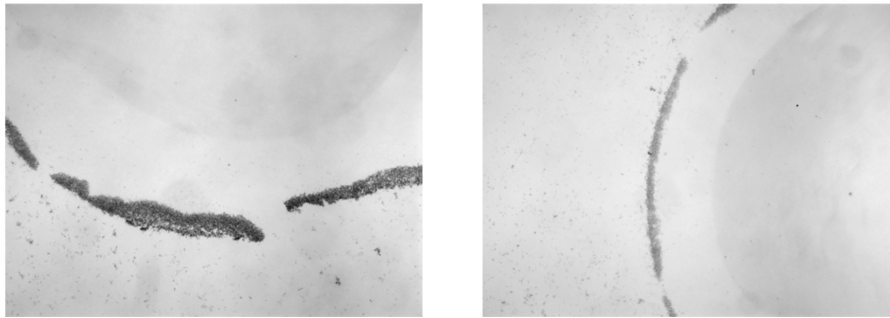
Auch für die Wildtypzellen waren große Schwankungen zwischen 10 und 35 % in der Negativkontrolle sichtbar und die Standardabweichungen waren teilweise deutlich größer als bei den HEK293-CXCR1 Versuchen. Jedoch konnte ein chemotaktischer Einfluss von IL-8 bei keiner der beiden IL-8 Konzentrationen beobachtet werden. Der Antikörper gegen IL-8 hatte dementsprechend auch keine Wirkung auf die Zellen und ihr migratorisches Verhalten. Es wurde somit ein Unterschied zwischen den Wildtyp HEK293 und den mit CXCR1 transfizierten Zellen gezeigt. Die HEK293-Zellen sind nur durch Expression des zu IL-8 korrespondierenden G-Protein gekoppelten Rezeptors CXCR1 befähigt, IL-8 zu erkennen und in Richtung höherer Konzentrationen zu migrieren.

Nach Optimierung des Transwellassays für adhärente Zellen wurden die mit CXCR1/EGFP transfizierten HEK293-Zellen auf ihre chemotaktische Antwort hin untersucht (Abbildung 5.13D, E). Da diese Zellen auf eine andere Art transfiziert wurden und somit andere Expressionslevel des CXCR1 aufweisen können, kann das Migrationsverhalten nach IL-8 sich von dem der bisher verwendeten HEK-Zellen unterscheiden. Die gewählten Parameter entsprachen den optimierten Parametern für HEK293-CXCR1 (Tabelle 5.3). Abbildung 5.13D zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrolle, jedoch nur bei einer IL-8 Konzentration von  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Die Negativkontrolle war mit 10 % sehr niedrig, jedoch konnte zur IL-8 Konzentration von  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Mit über 40 % zeigte die IL-8 Konzentration von  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  eine vierfach höhere Zellzahl als die Negativkontrolle und dieser Effekt konnte durch den anti-IL-8 Antikörper inhibiert werden. Bei Wiederholung des Versuchs wird jedoch deutlich, dass auch hier die Reproduzierbarkeit nicht gegeben war (Abbildung 5.13E). Auch in diesem Fall sind die Negativkontrollen mit 25 % erneut relativ hoch und die Vermutung, dass es einen Zusammenhang zwischen hoher Zellzahl in der Negativkontrolle und keiner beobachtbaren Chemotaxis der Zellen gibt, wurde bestärkt.

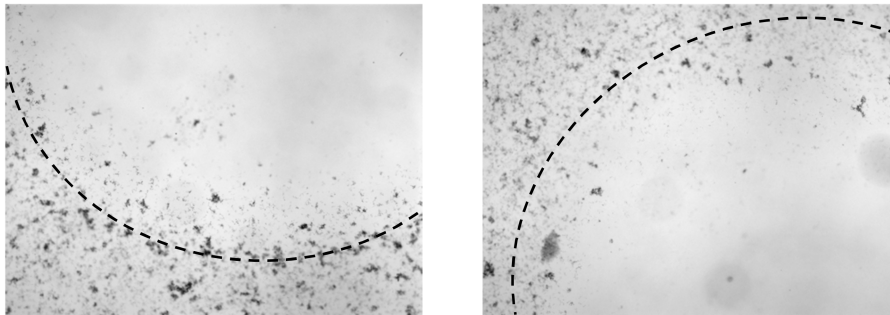
Zur Untersuchung, ob es sich wirklich um Chemotaxis handelt, wurde zusätzlich zum Transwellassay, der offenbar ein ungeeignetes Format darstellt, ein Agarosespotassay etabliert. In diesem wird ein Tropfen warmer Agarose mit Chemokinlösung versetzt und auf einer Oberfläche aushärten lassen. Gibt man nun Zellen hinzu, können diese, geleitet durch das Chemokin, in den Agarosespot einwandern (Abbildung 5.14). Als Negativkontrolle wird ein Spot mit PBS auf die gleiche Weise behandelt, in den die Zellen nicht einwandern sollten. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, wie sich die Zellen außen am Rand des Agarosespots ohne IL-8 sammelten. Es war keine Migration in den Spot sichtbar. Im mit IL-8 versehenen Agarosespot war kein klar definierter Rand des Spots mehr sichtbar, da die Zellen in den Spot hinein migrierten. Es konnte daher eindeutig von Chemotaxis gesprochen werden. Mit dem Agarosespotassay wurde bewiesen, dass die HEK293-CXCR1 Chemotaxis in Antwort auf einen IL-8 Gradienten zeigen. Dieser Assay ist jedoch ebenfalls nicht quantitativ und es konnte somit nur qualitativ bestätigt werden, dass es sich um Chemotaxis handelt.

Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der Transwellassays und der deutlich geringeren chemotaktischen Antwort der HEK293-CXCR1 im Vergleich zu primären, humanen Neutrophilen wurden diese nicht für weitere Migrationsassays verwendet. Jedoch war zu vermuten, dass die Aktinpolymerisation in diesen Zellen einen signifikanten und quantifizierbaren Unterschied zwischen aktivierten und nicht aktivierten Zellen aufweist, weshalb sie Verwendung in der Entwicklung eines Aktinpolymerisationsassays in lebenden Zellen fanden (Kapitel 5.2.4).

### PBS-Spots



### IL-8-Spots



**Abbildung 5.14:** Mikroskopische Aufnahmen des Agarosespotassays mit PBS (oben) und IL-8 (unten). Bei den IL-8 Spots ist der Rand der Spots durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Vergrößerung: 5x. Verwendete Zelllinie: HEK293-CXCR1, Klon: B8.

## Untersuchung des chemotaktischen Einflusses von IL-8 auf Endothelzellen

Die Expression der beiden IL-8 Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 von HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) und die Migration dieser Zellen entlang von IL-8 Gradienten wird seit Jahren untersucht und die Literatur zeigt kontroverse Ergebnisse.<sup>[152,155,157,159]</sup> In dieser Arbeit wurde die Migrationsfähigkeit dieser Zellen auf IL-8 als ein alternatives System zu Neutrophilen untersucht. Es wurde erneut der Transwellassay als Migrationssystem verwendet, wobei die für HEK293-CXCR1 optimierten Parameter gewählt wurden (Tabelle 5.3). Die Ergebnisse dreier unabhängiger Transwellassays mit HUVECs sind in Abbildung 7.1 (Anhang) zu finden. In keinem der drei Versuche konnte ein Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrollen aufgezeigt werden. Auffällig war, dass sich die Anzahl an unspezifisch adhärenierten Zellen und migrierenden Zellen in allen drei Versuchen stark unterschied, wie es bereits auch bei den HEK293-Zellen zu beobachten war. Während im ersten Versuch in allen Kontrollen nur ca. 30 % migrierten, wurden im zweiten Versuch 75 % und im dritten 50 % Migration bestimmt. Somit waren diese Zellen nicht als IL-8 chemotaktisch responsives Zellmodell geeignet, da sie keine Chemotaxis nach IL-8 zeigten.

Die *endothelial colony-forming cells* (ECFC) sind Endothelvorläuferzellen und könnten daher ebenfalls in der Lage sein, nach IL-8 zu migrieren, obwohl dazu keine Literatur existiert. Um dies zu testen, wurden erneut Transwellassays nach den bereits vorgestellten Parametern durchgeführt (Anhang Abbildung 7.2). Die Ergebnisse des Transwellassays zeigen, dass auch diese Zellen nicht nach



---

IL-8 migrieren. Negativ- und Positivkontrollen waren alle in etwa gleich bei ca. 50 % Migration. Somit konnten auch diese Zellen nicht für weitere Versuche verwendet werden.

Die Untersuchung der beiden Endothelzellen HUVEC und ECFC zur Migration nach IL-8 ergab, dass auch diese Zellen nicht als IL-8 responsives Zellsystem verwendet werden können. Neutrophile Granulozyten waren weiterhin trotz der aufwendigen Beschaffung und Isolierung sowie dem komplizierten Umgang die beste Wahl. Sie zeigten die mit Abstand stärkste Antwort auf IL-8 auf einer deutlich kleineren Zeitskala im Vergleich zu den HEK293-CXCR1 und wurden somit für alle weiteren Chemotaxisversuche verwendet.

---

## 5.2 Assays zur Charakterisierung von und *High-Throughput Screening* nach Chemokininhibitoren

---

Zur Charakterisierung von Chemokininhibitoren sollte ein Assay zur Untersuchung ihrer biologischen Aktivität etabliert werden. Die Wirkung biologisch aktiver Substanzen sollte dabei auf Ebene der Zellmigration nachgewiesen werden, da es diesen Prozess in pathologischen Zusammenhängen zu inhibieren gilt. Dazu wurde der Transwellassay verwendet, der semi-quantitativ eine Aussage über die Migration zulässt. Dieser ist jedoch nur zur Charakterisierung und nicht zum Identifizieren neuer Inhibitoren aus Substanzbibliotheken geeignet, da aufgrund der aufwendigen Durchführung kein *High-Throughput* Format realisierbar ist. Die Aktinpolymerisation bietet dazu einen alternativen Ansatzpunkt und ist ein Maß für Chemotaxis, denn kann die Aktinpolymerisation als deren Vorstufe inhibiert werden, wird auch keine Chemotaxis stattfinden. Neben der Verwendung des klassischen Aktinpolymerisationsassays<sup>[161]</sup> wurde ein alternativer Assay in lebenden Zellen entwickelt, der im HTS-Format genutzt werden kann und somit zum Identifizieren von neuen Inhibitoren in Substanzbibliotheken geeignet sein soll.

---

### 5.2.1 Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im Transwellassay

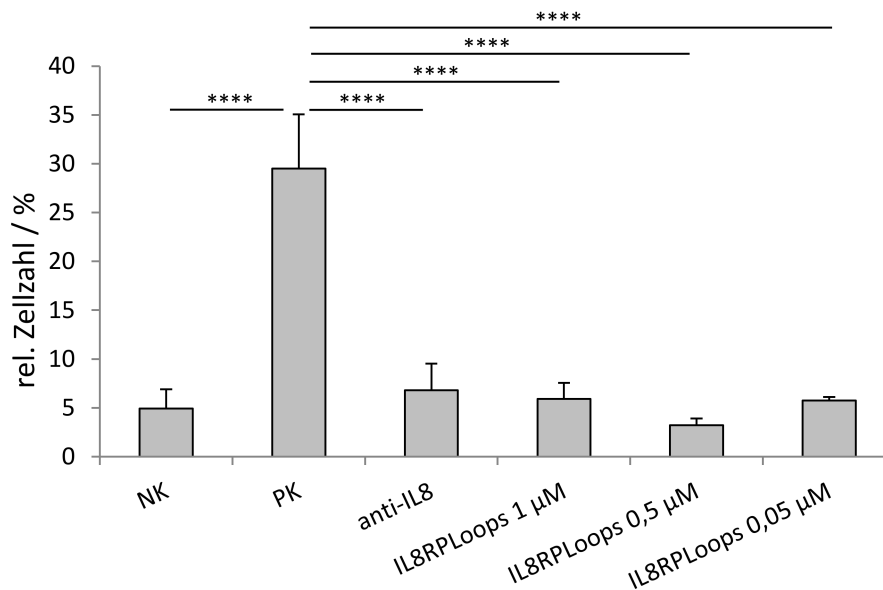
---

IL8RPLoops ist ein Inhibitorpeptid für IL-8 abgeleitet aus dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1, das eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $0,5\mu\text{M}$  aufweist.<sup>[230]</sup> Dieses von Helmer *et al.* entwickelte Peptid sollte auf seine Inhibition der biologischen Aktivität von IL-8 auf neutrophile Granulozyten getestet werden. Teile dieser Arbeit wurden bereits in *RSC Advances* 2015 veröffentlicht.<sup>[230]</sup>

Zum Nachweis der Inhibition der IL-8 induzierten Chemotaxis durch einen im Arbeitskreis entwickelten Inhibitor wurde der Transwellassay mit neutrophilen Granulozyten verwendet. In Kapitel 5.1.1 wurde bereits der Nachweis der Aktivität des rekombinant hergestellten Chemokins IL-8 auf Neutrophile mithilfe dieses Assays gezeigt. Die Zellzahlbestimmung zum Nachweis der Chemotaxis erfolgte bei diesen Assays mit Calcein-AM Färbung und anschließender Detektion der Fluoreszenz im grünen Kanal. Da die meisten, in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren jedoch mit Fluorescein konjugiert sind und somit bei der gleichen Wellenlänge wie das Calcein fluoreszieren, wurden die in die untere Kammer migrierten Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Der erste Transwellassay im 96-Well-Format mit dem Inhibitorpeptid IL8RPLoops wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen an IL8RPLoops, die sich um den  $K_D$ -Wert von  $0,5\mu\text{M}$  bewegten ( $1$ ,  $0,5$  und  $0,05\mu\text{M}$ ) und jeweils  $0,1\mu\text{M}$  IL-8 durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Antikörperkontrolle mit einem anti-IL-8 Antikörper durchgeführt, um zu zeigen, dass die IL-8 induzierte Chemotaxis spezifisch durch Bindung des IL-8 inhibiert werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.15 dargestellt.

Die Positivkontrolle mit 30 % Migration zeigte einen höchst signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle mit nur 5 % Migration. Der anti-IL-8 Antikörper konnte die IL-8 vermittelte Chemotaxis auf ca. 7 % Migration inhibieren. Dies entspricht ungefähr einem Viertel der Ausgangsaktivität. Alle drei Inhibitorpeptidkonzentrationen resultierten in etwa gleicher Zellmigration zwischen 3 und 6 % und waren somit im gleichen Bereich wie die Negativ- und die Antikörperkontrolle. Es wurde kein

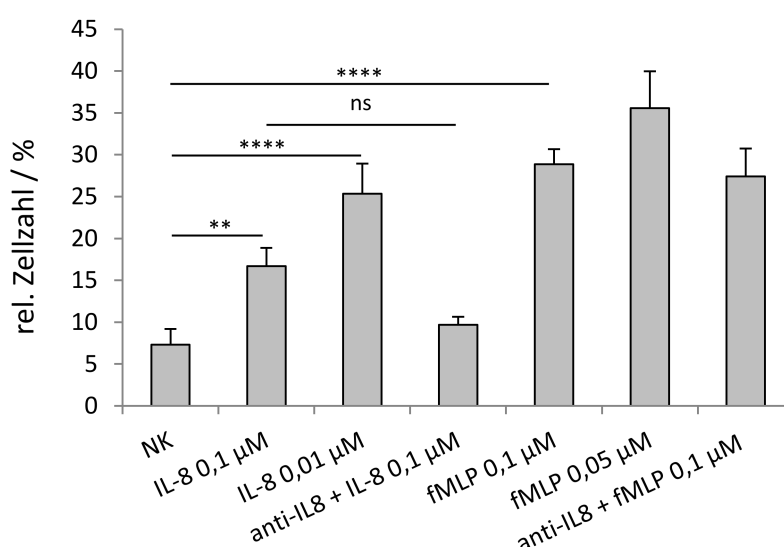


**Abbildung 5.15:** Transwellassay zum Test der Wirkung von IL8RPLoops auf die chemotaktische Aktivität von IL-8 auf neutrophile Granulozyten. PK (Positivkontrolle) entspricht 0,1 µM IL-8 und NK (Negativkontrolle) enthält kein IL-8. 0,1 µM IL-8 wurde auch für die Antikörperkontrolle (anti-IL-8, 6 µg mL<sup>-1</sup>) und die IL8RPLoops Tests eingesetzt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in der unteren Kammer des Transwellsystems in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3). Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

konzentrationsabhängiger Effekt von IL8RPLoops auf die Chemotaxis beobachtet. Das Peptid scheint daher wirksamer als aufgrund der Affinität zu IL-8 zu erwarten gewesen wäre und es scheint weitere Effekte zu geben. Bei der Verwendung der  $K_D$ -Konzentration liegt 52 nM IL-8, also etwa die Hälfte der IL-8 Moleküle, gebunden vor. Diese Konzentration sollte ebenfalls noch Chemotaxis in Neutrophilen induzieren. Die nahezu vollständige Inhibition der Chemotaxis ist somit entweder auf den Assay oder auf andere Effekte des Inhibitorpeptids auf Zellen zurückzuführen.

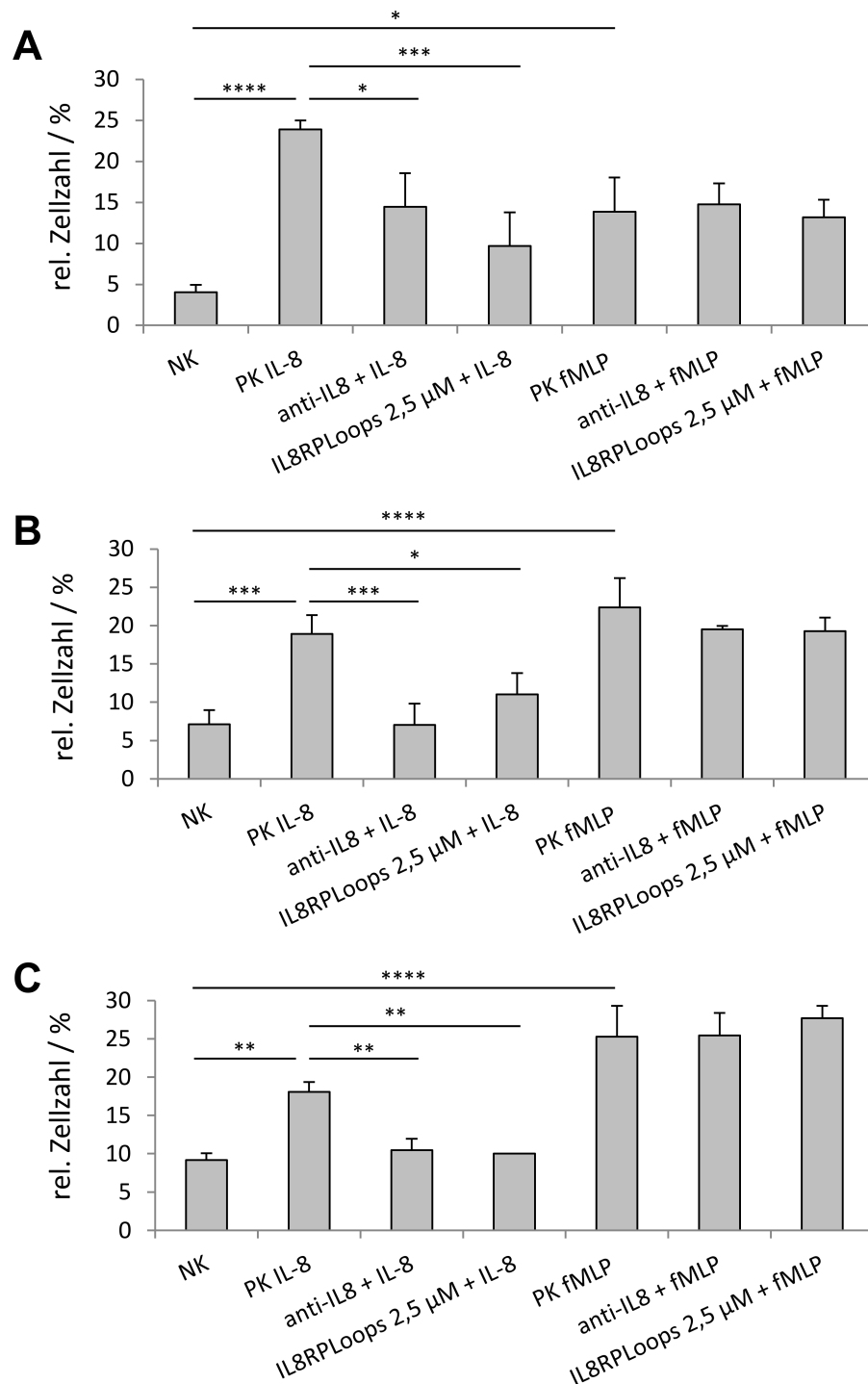
Anschließend wurde ein weiteres, chemotaktisch aktives Tripeptid, *N*-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin (fMLP), für neutrophile Granulozyten in den Transwellassay miteinbezogen. fMLP ist ein bakterielles Produkt, dass Chemotaxis in Neutrophilen mit einer  $ED_{50}$  von  $7 \cdot 10^{-11}$  M induzieren kann.<sup>[231,232]</sup> Bei Verwendung dieses Chemoattraktanten in Verbindung mit dem Inhibitor IL8RPLoops kann getestet werden, ob die Inhibition spezifisch für IL-8 ist und ein Effekt des Peptids auf die Zellen oder den Rezeptor ausgeschlossen werden können. An dieser Stelle musste das Transwellsystem von Corning zu Merck Millipore (aufgrund von Lieferschwierigkeiten) gewechselt werden. Hier zeigten sich wie auch bereits bei den HEK293-CXCR1-Zellen Probleme bei der Verwendung des Transwellassays (Anhang Abbildung 7.3). Die beiden Positivkontrollen mit IL-8 und fMLP zeigten zwar erhöhte Migration im Vergleich zur Negativkontrolle, jedoch lagen sie mit nur ca. 7 % deutlich unter den erwarteten Werten. Überraschend war auch, dass die beiden Antikörperkontrollen mit IL-8 und fMLP, beide bei ca. 15 % Migration, doppelt so hohe Werte lieferten wie die Positivkontrollen. Der Grund hierfür war im geänderten Transwellsystem zu finden. Das neue System war aufgrund einer sehr hydrophoben Oberfläche der unteren Kammern deutlich empfindlicher bei der

Gradientenbildung als das System von Corning. Die hydrophobe Oberfläche der unteren Kammern sorgt für eine große Oberflächenspannung des wässrigen Puffers und führt somit zu einer starken Krümmung der Lösung. Wird die obere Kammer, die nicht so stark hydrophob ist, in die untere eingesetzt, verteilt sich die Lösung sofort und es herrschen weitere Kräfte, die den Gradienten in der Membran beeinflussen. Der Versuch wurde ohne die IL8RPLoops Inhibition wiederholt und es wurde sehr genau auf das vorsichtige Zusammensetzen der oberen in die unteren Kammer geachtet, damit sich der Gradient optimal über die Membran ausbilden konnte. Da die IL-8 und auch die fMLP induzierte Chemotaxis in Neutrophilen einen glockenförmigen Konzentrationsverlauf aufweist, liegt mit  $0,1 \mu\text{M}$  nicht unbedingt die optimale Konzentration vor. Daher wurde zusätzlich jeweils eine weitere IL-8 und fMLP Konzentration von  $10 \text{ nM}$  getestet, um eventuell einen höheren Effekt der Chemotaxis zu erzielen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.16 gezeigt.



**Abbildung 5.16:** Transwellassay zur Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von IL-8 und fMLP auf neutrophile Granulozyten. Die eingesetzte anti-IL-8 Konzentration entspricht  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in der unteren Kammer des Transwellsystems in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

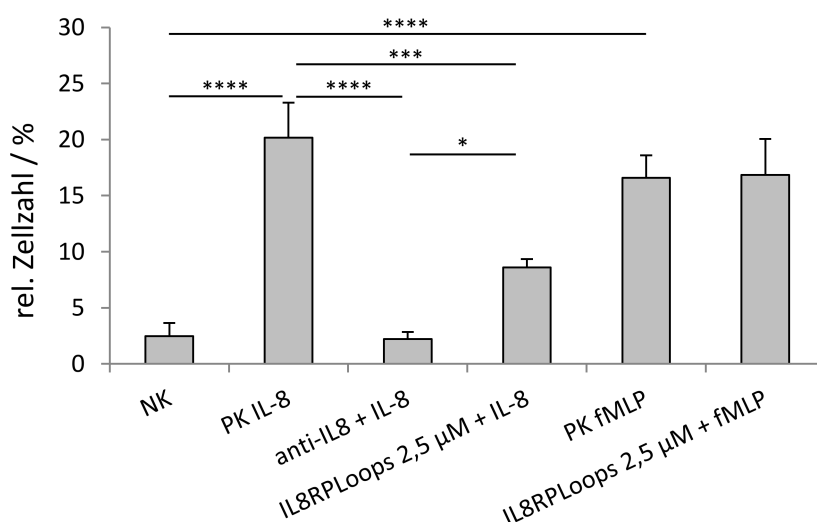
Beide Positivkontrollen für IL-8 zeigten mit über 15 bzw. 25 % Migration im Vergleich zur Negativkontrolle mit 7 % Migration Chemotaxis an, die jedoch nicht signifikant durch den anti-IL-8 Antikörper inhibiert werden konnte, obwohl der Wert kaum höher war als der der Negativkontrolle. Die geringere Konzentration von  $10 \text{ nM}$  IL-8 scheint einen größeren, chemotaktischen Einfluss auf die Zellen zu haben und daher wurde für Folgeversuche diese Konzentration verwendet. Auch fMLP zeigte für die beiden eingesetzten Konzentrationen eindeutig einen chemotaktischen Effekt, der den Erwartungen entsprechend, nicht durch den Antikörper gegen IL-8 beeinflusst wurde. Im Fall von fMLP konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konzentrationen nachgewiesen werden, weshalb weiterhin eine Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  verwendet wurde. Nachdem der Assay mit dem neuen System erfolgreich durchgeführt werden konnte, folgten Inhibitionsversuche mit dem Inhibitorpeptid IL8RPLoops (Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17:** Transwellassay zur Inhibition der chemotaktischen Aktivität von IL-8 auf neutrophile Granulozyten mit IL8RPLoops. fMLP dient als Kontrolle für die spezifische Wirkung des IL8RPLoops auf IL-8. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente. PK entsprechen jeweils 0,01  $\mu$ M IL-8 bzw. 0,1  $\mu$ M fMLP. Diese IL-8 und fMLP Konzentrationen wurden ebenfalls für die Antikörperkontrollen (anti-IL-8, 6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) und die IL8RPLoops Inhibitionsversuche eingesetzt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in der unteren Kammer des Transwellsystems in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n = 3). Die Signifikanzniveaus wurden mit *One-way ANOVA* und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

In Abbildung 5.17A ist eindeutig zu erkennen, dass beide Positivkontrollen, IL-8 und fMLP, Chemotaxis in Neutrophilen induzierten. Der IL-8 vermittelte Effekt konnte mit dem anti-IL-8 Antikörper inhibiert werden, nicht aber der des fMLP, entsprechend der Erwartungen. Eine fünffach höhere Konzentration als der  $K_D$  des IL8RPLoops ( $2,5 \mu\text{M}$ ) konnte ebenfalls die IL-8 vermittelte Chemotaxis inhibieren, jedoch nicht die fMLP vermittelte. Die in Abbildung 5.17B und C dargestellten Ergebnisse zeigen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, auch wenn die jeweils absoluten Zellzahlen variierten. Die drei unabhängigen Experimente belegten, dass das IL8RPLoops die chemotaktische Wirkung von IL-8 in neutrophilen Granulozyten inhibiert, nicht aber die des fMLP, und somit spezifisch an IL-8 bindet. Eine quantitative Bestimmung der Inhibition war aufgrund der Schwankungen der einzelnen Versuche nicht möglich.

Da offenbar das Transwellssystem von Merck Millipore für die schlechteren Ergebnisse verantwortlich war, wurde im letzten Schritt das 24-Well-System von Corning getestet, das angeblich deutlich robuster<sup>c</sup> sein soll. Es wurde der gleiche Versuch, wie in Abbildung 5.17 dargestellt, durchgeführt (Abbildung 5.18). Die Ergebnisse des 24-Well-Transwellsystems stimmten mit denen des 96-Well-Systems überein, jedoch sind die Standardabweichungen kleiner und die erhaltenen Ergebnisse signifikanter. In diesem Assay konnte erstmals ein signifikanter Unterschied zwischen der Antikörper- und der IL8RPLoops Inhibition aufgezeigt werden. Wiederholungen mit diesem System bestätigten dieses Ergebnis und belegten, dass das 24-Well-System tatsächlich robuster ist und aussagekräftigere Ergebnisse lieferte. Es sollte für alle weiteren Transwellexperimente gewählt werden. Zwei weitere im Rahmen dieser Arbeit mit dem 24-Well-Transwellassay getestete Inhibitoren sind in der Arbeit von Dr. Dorothea Helmer zu finden.<sup>[218]</sup>

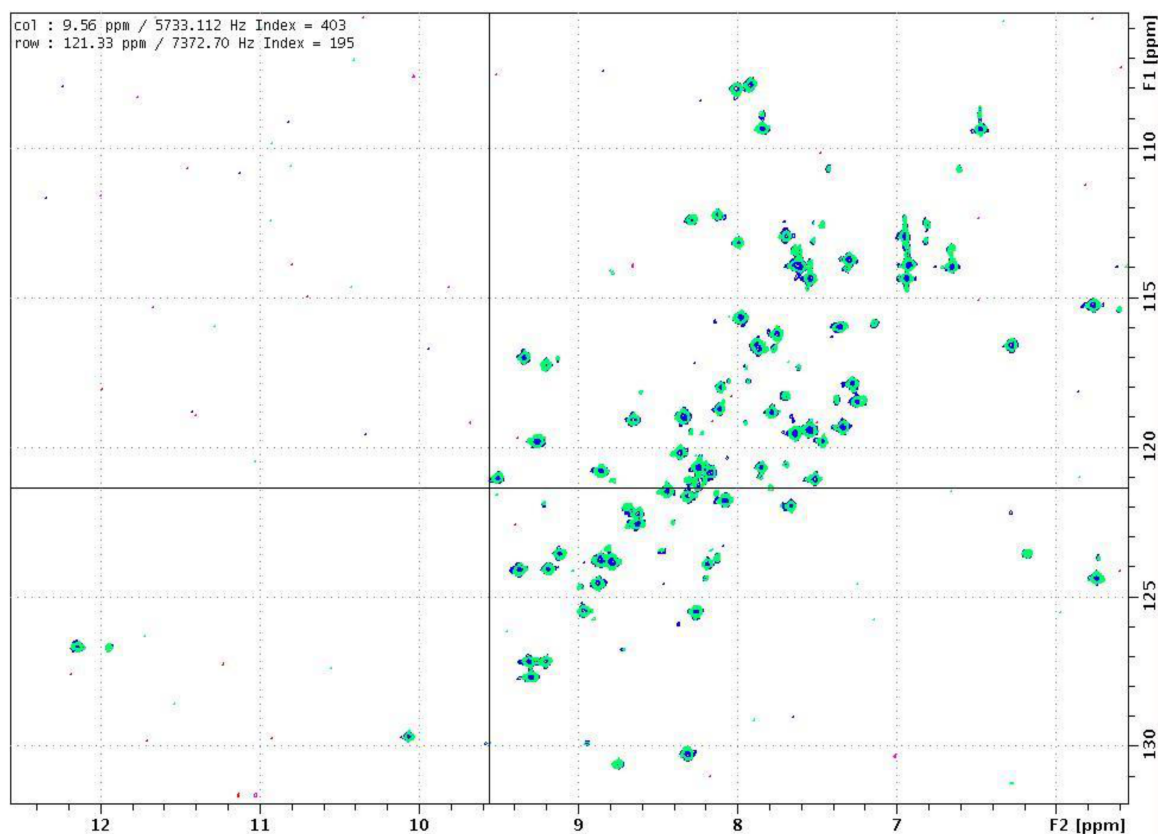


**Abbildung 5.18:** 24-Well-Transwellassay zur Inhibition der chemotaktischen Aktivität von IL-8 auf neutrophile Granulozyten mit IL8RPLoops. PK entsprechen jeweils  $0,01 \mu\text{M}$  IL-8 bzw.  $0,1 \mu\text{M}$  fMLP. Diese IL-8 und fMLP Konzentrationen wurden ebenfalls für die Antikörperkontrollen (anti-IL-8,  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und die IL8RPLoops Inhibitionsversuche eingesetzt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in der unteren Kammer des Transwellsystems in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ). Die Signifikanzniveaus wurden mit One-way ANOVA und dem Tukeys Post-Hoc-Mehrfachvergleichstest bestimmt.

<sup>c</sup> Persönliche Kommunikation mit anderen Nutzern des Transwellassays.

## 5.2.2 NMR-Studien zur Aufklärung der Bindung eines IL-8 Inhibitorpeptids an IL-8

Zur Bestätigung der von Helmer *et al.* vorgeschlagenen Bindungsregionen des Inhibitorpeptids IL8RPLoops für IL-8<sup>[230]</sup> sollten NMR-Studien mit rekombinant hergestelltem, <sup>15</sup>N-markiertem IL-8 durchgeführt werden. NMR-Studien mit Proteinen haben den Vorteil, dass sie in Lösung und ohne Markierung, die die Bindung stören kann, durchgeführt werden können. Dieses Verfahren findet breite Anwendung zur Aufklärung von Proteininteraktionen.<sup>[233,234,235,236,237]</sup> Dabei werden vor allem Protein/Peptid-Interaktionen, bei der das Peptid eine entsprechende Sequenz des zu untersuchenden Proteins aufweist, als Modell untersucht.<sup>[234,235]</sup> Es wurde ein HSQC-Spektrum zunächst von reinem <sup>15</sup>N-IL-8 aufgenommen<sup>d</sup> und mit dem von Grasberger *et al.* publizierten Spektrum<sup>[238]</sup> verglichen. Die Verschiebungen der beiden Spektren waren nahezu identisch und somit wurde die Struktur des rekombinant hergestellten <sup>15</sup>N-IL-8 mit NMR bestätigt. Anschließend wurde zu <sup>15</sup>N-IL-8 eine definierte Menge IL8RPLoops zugegeben und es wurde ein weiteres HSQC-Spektrum aufgenommen (Abbildung 5.19).



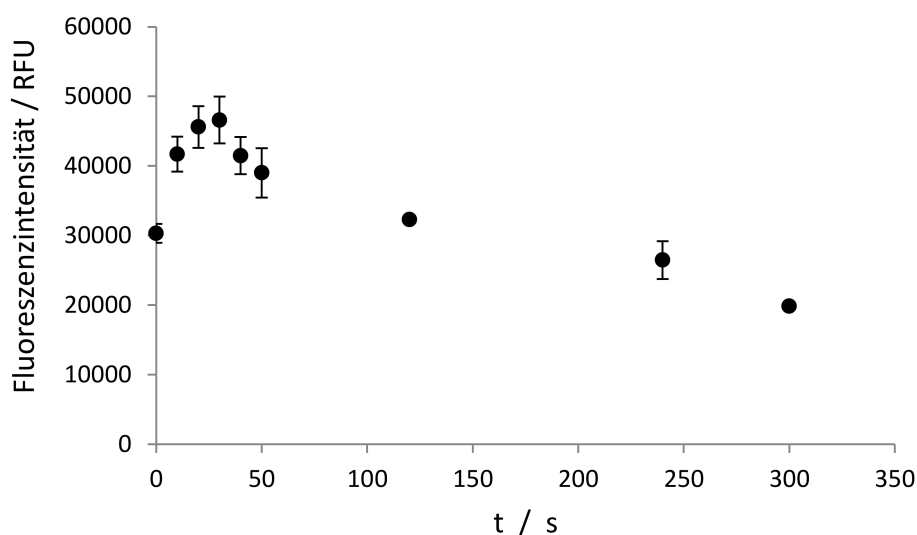
**Abbildung 5.19:** Überlagerung der beiden HSQC-Spektren des <sup>15</sup>N-IL-8 (blau) und nach Zugabe von IL8RPLoops zu <sup>15</sup>N-IL-8 (grün). Es wurden die Counterlevels für das Peptid reduziert, damit die grünen Peaks die blauen nicht überlagern und somit alles zuzuordnen ist. Die Spektren sind identisch und zeigen keine Verschiebungen in den Signalen relativ zueinander.

<sup>d</sup> Die Messungen wurden von Dr. Claudia Muhle-Goll am IOC/IBG-4- Magnetische Resonanz, Karlsruher Institut für Technologie, durchgeführt.

Beide Spektren, sowohl das des reinen IL-8 als auch das der Mischung aus Protein und Peptid, zeigten identische Verschiebungen und es waren keine Unterschiede erkennbar. Somit konnte keine Bindung des Peptids an IL-8 beobachtet werden. Problematisch war, dass IL8RPLoops mit einer Konzentration von  $300\text{ }\mu\text{M}$  so hoch konzentriert eingesetzt werden musste, sodass das Peptid die Grenze seiner Löslichkeit überschritt und ausfiel. Es konnte in diesem Zustand vermutlich nicht mehr an IL-8 binden und es wurde auch kein Unterschied in den NMR-Signalen detektiert. Das Ausfallen des Komplexes wurde ausgeschlossen, da sich die Intensitäten der beiden Spektren ohne Reduktion der Counterlevel kaum voneinander unterschieden und somit weiterhin IL-8 in Lösung vorlag.

### 5.2.3 Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im klassischen Aktinpolymerisationsassay

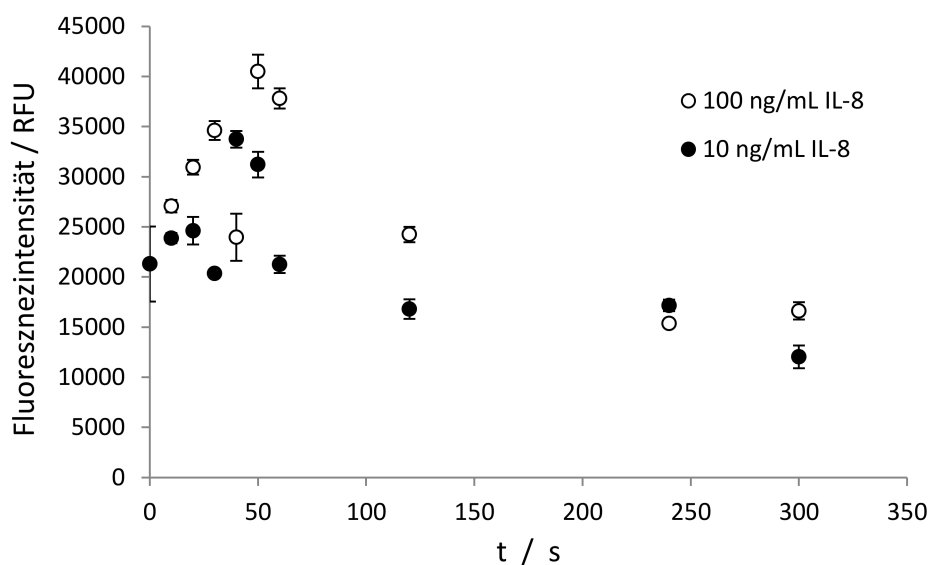
Die Aktinpolymerisation bildet als Vorstufe der Chemotaxis eine weitere Antwort von neutrophilen Granulozyten auf IL-8, anhand dessen die Inhibition durch das Peptid IL8RPLoops untersucht werden konnte. Der Nachweis der Aktinpolymerisation erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten Derivat des Pilzgifts Phalloidin, das bevorzugt an F-Aktin bindet und so die Depolymerisation verhindert, wodurch das Gleichgewicht von G-Aktin zu F-Aktin verschoben wird.<sup>[160,161]</sup> Für den Nachweis wurden neutrophile Granulozyten mit IL-8 aktiviert und nach bestimmten Zeitpunkten wurde durch Fixierung in Paraformaldehyd der Zustand der Zellen und somit auch die Menge an polymerisiertem Aktin eingefroren. Da Phalloidin nicht zellpermeabel ist, musste im nächsten Schritt die Membran mit Triton X-100 permeabilisiert werden, bevor anschließend fluoreszenzmarkiertes Phalloidin hinzugegeben wurde, das nun in die Zelle diffundieren und F-Aktin binden konnte. Durch Messung der Fluoreszenzintensität der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben konnte die Aktinpolymerisation über die Zeit verfolgt werden (Abbildung 5.20).



**Abbildung 5.20:** Zeitabhängiger Aktinpolymerisationsassay mit neutrophilen Granulozyten, die mit  $100\text{ ng mL}^{-1}$  Interleukin-8 stimuliert wurden. Messung der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-Atto488 ( $\lambda_{\text{Ex}} = 501\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 521\text{ nm}$ ) in fixierten, permeabilisierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).



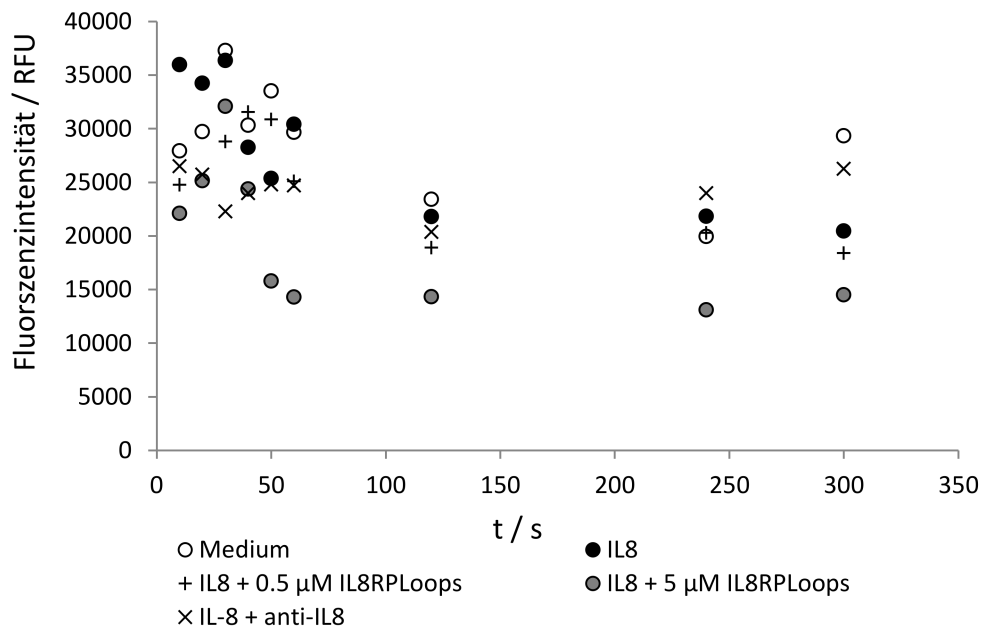
Der kurzzeitige Anstieg des F-Aktins ist ein charakteristischer Effekt von Chemoattraktanten. Dieser konnte eindeutig in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden und zeigte sein Maximum nach 30 s Aktivierung mit IL-8. Anschließend wurde der Einfluss zwei verschiedener IL-8 Konzentrationen auf die Aktinpolymerisation getestet (Abbildung 5.21), da bereits im Transwellassay ein Unterschied zwischen 10 und 100 nM festgestellt worden war. Die maximale Fluoreszenzintensität ist bei 100 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 fast 15 % höher als bei 10 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 und das Maximum verschob sich. Bei 10 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 lag das Maximum bei 40 s, jedoch ist der Wert für 30 s viel zu niedrig und kann daher vermutlich als Ausreißer gesehen werden. Bei 100 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 konnte das Maximum bei 50 s beobachtet werden, jedoch war auch hier ein Ausreißer bei 40 s vorhanden. Aufgrund der höheren Intensität des Aktinpolymerisationsmaximums der mit 100 ng mL<sup>-1</sup> stimulierten Zellen wurde diese Konzentration für weitere Versuche verwendet.



**Abbildung 5.21:** Zeitabhängiger Aktinpolymerisationsassay mit neutrophilen Granulozyten, die mit 10 bzw. 100 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 stimuliert wurden. Messung der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-Atto488 ( $\lambda_{\text{Ex}} = 501$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 521$  nm) in fixierten, permeabilisierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Nachdem der Nachweis der Aktinpolymerisation in Neutrophilen nach Stimulierung mit IL-8 erfolgreich war und ein Maximum ermittelt werden konnte, folgten Inhibitionsversuche mit einem anti-IL-8 Antikörper und dem Inhibitorpeptid IL8RPLoops. Zusätzlich wurde reines Medium als Negativkontrolle mitgeführt. Da IL8RPLoops fluoresceinmarkiert war und die Fluoreszenz somit die des Phalloidin-Atto488 verfälschen konnte, wurde ein anderes Phalloidinkonjugat, Phalloidin-iFluor555, verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.22 dargestellt.

Dieser Versuch zeigte für die Negativkontrolle (nur mit Medium stimulierte Zellen) einen vergleichbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität zu den mit IL-8 stimulierten Zellen. Es konnte für den anti-IL-8 Antikörper ein inhibitorischer Effekt gezeigt werden, jedoch ist die Aussage dieses Ergebnisses gering, da bereits die Negativkontrolle eine Stimulierung gezeigt hatte. Für die beiden getesteten Konzentrationen des IL8RPLoops konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Wiederholungen dieses Versuchs bestätigten die Ergebnisse. Das Medium führte nicht jedes Mal zu einer



**Abbildung 5.22:** Aktinpolymerisationsassay mit neutrophilen Granulozyten zum Nachweis der Inhibition von  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 mit einem anti-IL-8 Antikörper ( $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und IL8RPLoops. Messung der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-iFluor555 ( $\lambda_{\text{Ex}} = 556 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 574 \text{ nm}$ ) in fixierten, permeabilisierten Zellen.

Aktivierung der Zellen. Jedoch liegt die Fehlerquelle in der Durchführung. Dies verdeutlicht erneut die Problematik, dass frisch isolierte neutrophile Granulozyten sehr schnell mechanisch aktivierbar sind, ohne dass ein entsprechender Chemoattraktant vorhanden ist. Es wurden alle Versuche nacheinander durchgeführt, womit die Neutrophilen teilweise 60 min nach der Isolierung bis zur Verwendung verweilen. Es wurde festgestellt, dass diese Zeit zu lange ist und die Neutrophilen aggregieren, wodurch eine Vereinzelung der Zellen unmöglich war. Dieser Assay ist somit nicht zum Screenen einer großen Zahl von Inhibitoren geeignet, zumindest nicht bei der Verwendung von frisch isolierten Primärzellen, die möglichst schnell verwendet werden müssen. Durch die zeitintensive und aufwendige Durchführung, die keine Parallelansätze erlaubt, ist dieser Assay auch nicht im HTS-Format nutzbar.

#### 5.2.4 Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen

Da sich der klassische Aktinpolymerisationsassay zum Test von Inhibitoren als nicht robust genug herausstellte, sollte ein alternativer Assay im 96-Well-Format entwickelt werden, der die Durchführung paralleler Ansätze zulässt. Es wäre ein Assay von Interesse, bei dem die Aktinpolymerisation direkt zeitaufgelöst in einer großen Anzahl an lebenden Zellen nachgewiesen werden kann, da so die Durchführung stark vereinfacht und zeitlich verkürzt wird und der Test vieler Inhibitoren zur gleichen Zeit realisierbar ist. Auch ist damit eine Reduktion von Fehlerquellen verbunden, da die Zellen nur einmal in einer 96-Well-Platte vorgelegt und danach alle benötigten Lösungen zu den jeweiligen Kavitäten hinzugegeben werden. Einen weiteren Vorteil stellt die Verwendung einer großen Zellzahl dar, wodurch im Gegensatz zu Einzelzellassays wie dem *live Actinstain* <sup>[166,167,168]</sup> eine statistische Aussage erhalten wird. Der Nachweis kann, wie beim klassischen Aktinpolymerisationsassay, mit

---

fluoreszenzmarkiertem Phalloidin erfolgen, das bevorzugt an filamentöses Aktin bindet.<sup>[160,161]</sup> Phalloidin fördert die Polymerisation und es findet somit eine Hintergrundreaktion statt. Dieser Vorgang muss bei dem Aufbau des Assays berücksichtigt werden, da bereits ohne Zugabe eines Chemoattractanten durch Phalloidin die Aktinpolymerisation induziert werden kann. Weiterhin ist Phalloidin nicht membrangängig, sodass die Substanz in die Zelle gebracht werden muss. Dabei sollte jedoch die Viabilität der Zellen zumindest bis zum induzierten Anstieg der Aktinpolymerisation nicht beeinträchtigt werden. Dazu können prinzipiell drei Strategien verfolgt werden: die Mikroinjektion von Phalloidin<sup>[164,165]</sup> oder fluoreszenzmarkiertem Aktin<sup>[239]</sup> in die Zelle, die chemische Modifikation des Phalloidins zur Verbesserung der Zellgängigkeit<sup>[240,241]</sup> oder die Permeabilisierung der Membran<sup>[242,243,244,245,246]</sup>. Mikroinjektionen beschränken sich auf einzelne Zellen und es können keine gemittelten Werte über eine große Anzahl an Zellen erhalten werden. Außerdem ist die aufwendige Durchführung nicht für HTS geeignet. Chemische Modifikationen durch Konjugation von internalisierungsvermittelnden Resten, die entweder lipophil oder polykationisch sind, sorgen für den Transport des Phalloidins in die Zelle, ohne die Viabilität der Zelle dabei zu beeinträchtigen.<sup>[241]</sup> Das modifizierte Nitrobenzoxadiazol-Phalloidin (NBD-Phalloidin) wird sogar durch Autointernalisierung, vermutlich Pinozytose, von Zellen aufgenommen.<sup>[240]</sup> In dieser Arbeit wurde die dritte Strategie gewählt und es sollte die Membran mit einer geeigneten Substanz permeabilisiert werden, damit das Phalloidin in die Zelle gelangen kann und dabei die Zellviabilität weitestgehend erhalten bleibt. Zur Entwicklung dieses Assays wurden das Chemokin IL-8 und die CXCR1 transfizierten HEK293-Zellen verwendet. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen der Bachelor-Thesis von Maximilian Hungsberg durchgeführt.

### Permeabilisierung der Membran mit Saponin

Medepalli *et al.* beschreiben eine Technik zur reversiblen Permeabilisierung der Membran mit dem Reagenz Saponin.<sup>[247]</sup> Saponin ist ein aus Pflanzen stammendes Glykosid und findet bereits seit langer Zeit Anwendung zur Permeabilisierung von Zellmembranen und zur Einbringung von Peptiden und anderen Substanzen von bis zu 800 kDa in Zellen.<sup>[243,244,245,246]</sup> Die Behandlung von Zellen mit Saponin führt nur zu minimaler Freisetzung von intrazellulären Makromolekülen wie Proteinen und RNA aus der Zelle, zu minimalen Effekten auf die innere zelluläre Architektur und auch die Proteinsynthese findet weiterhin in vergleichbaren Level zu intakten Zellen statt.<sup>[246]</sup> Die von Medepalli *et al.* beschriebene Technik basiert auf der Permeabilisierung der Membran durch Saponin in einer hypotonischen Umgebung, sodass es aufgrund des osmotischen Drucks zu einem Einstrom der äußeren Lösung in die Zelle kommt. Dadurch können in der Lösung befindliche Substanzen in die Zelle transportiert werden, ohne dass Substanzen in größeren Mengen aus der Zelle entweichen. Die Permeabilisierung wird bei 4 °C durchgeführt.<sup>[247]</sup>

Medepalli *et al.* zeigten, dass Mischungen von 50 und 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponinlösungen mit einem hypotonischen Puffer im Verhältnis 3:2 (v:v) zur Permeabilisierung von einer aus Ratten stammenden Myoblastenzelllinie führten, ohne die Viabilität der Zellen in einem signifikanten Maß zu beeinflussen. Dabei fand die Inkubation mit Saponin für 5 bzw. 10 min bei 4 °C statt.<sup>[247]</sup> Johnson *et al.* setzten der Permeabilisierungslösung mit Saponin 6 mM ATP hinzu und zeigten, dass ATP die Permeabilisierung unterstützt und das Zellüberleben erhöht.<sup>[244]</sup>

In Anlehnung an diese Parameter wurden erste Versuche im Rahmen der Bachelor-Thesis von Maximilian Hungsberg durchgeführt. Dabei wurden die HEK293-CXCR1 Zellen mit 50, 75 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin mit und ohne 6 mM ATP und Phalloidin für 5 bzw. 10 min auf Eis inkubiert, bevor nach mehrmaligen Waschen mit hypotonischen Puffer (3:2), PBS und Zellkulturmedium die Zellen zur Regeneration 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuche erläutert. 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin zeigte eine geringere Aufnahme an Phalloidin, bestimmt über die Fluoreszenzintensität des von den Zellen aufgenommenen Atto488-Phalloidins, als 75 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , die beide in etwa gleiche Werte aufwiesen. Die Überprüfung der Zellviabilität mit Resazurin zeigte, dass bei 50 und 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin die Zellen größtenteils vital waren, während bei 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin die Zellviabilität deutlich abnahm. Dabei konnten für die zehnminütige Permeabilisierungszeit höhere Fluoreszenzintensitäten und deutlichere Unterschiede zu den unbehandelten Zellen erhalten werden. Weiterhin wurden verschiedene Phalloidinkonzentrationen getestet. Zunächst wurde Phalloidin-Atto488 verwendet, das im grünen Kanal fluoresziert. Neben einer Phalloidinkonzentration von 40 nM, die bereits im klassischen Aktinpolymerisationsassay verwendet worden war, aber hier zu sehr niedrigen Fluoreszenzintensitäten geführt hatte, wurden auch 80 und 160 nM Phalloidin getestet. Diese Konzentrationen resultierten in gut messbaren Fluoreszenzintensitäten, wobei diese im Vergleich zueinander keine großen Unterschiede zeigten und aus diesem Grund die 80 nM Konzentration gewählt wurde. Aus diesen Versuchen ergaben sich die Parameter, mit denen die Entwicklung des Assays begonnen wurde (Tabelle 5.4). Im Folgenden wurden alle Versuche aus Kostengründen in Zweifachbestimmung durchgeführt und daraus ein Mittelwert und dessen Standardabweichung ermittelt.

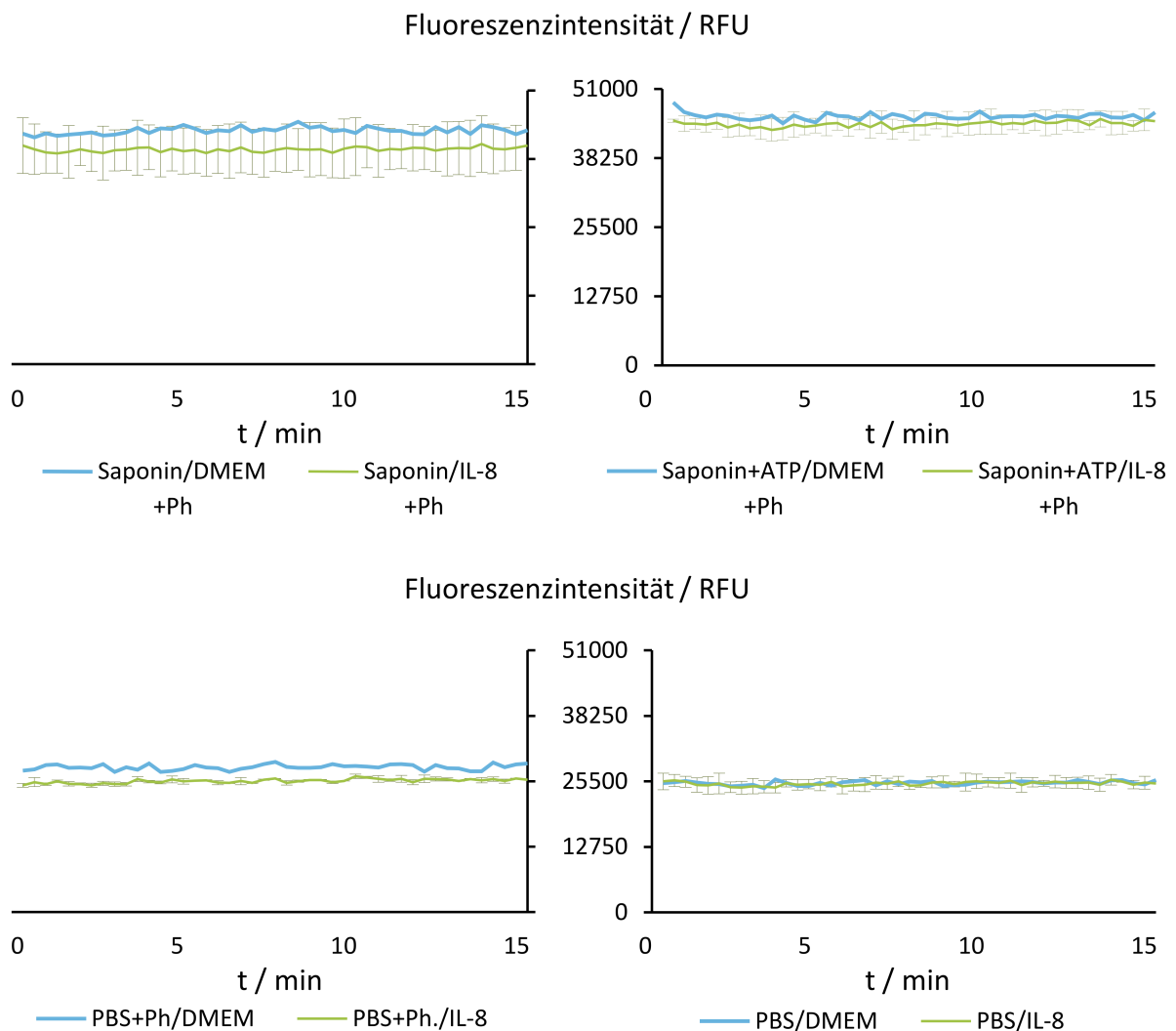
**Tabelle 5.4:** Optimierte Parameter der Permeabilisierung der HEK293-CXCR1-Zellen mit Saponin zur Einbringung von Phalloidin in die Zellen aus der Bachelor-Thesis von Maximilian Hungsberg.

Parameter	Optimierter Wert
Permeabilisierungszeit	10 min
c(Saponin)	75 $\mu\text{g mL}^{-1}$
c(Phalloidin)	80 nM

#### Optimierung der IL-8 induzierten Aktinpolymerisation *in vitro* in HEK293-CXCR1-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Phalloidin erfolgreich mit den in Tabelle 5.4 aufgeführten Parametern in lebende Zellen eingebracht werden kann, bestand das weitere Vorgehen in der Kombination der Einbringung von Phalloidin und der Induktion der Aktinpolymerisation in Zellen durch IL-8 sowie der Detektion dieses Signals durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Es wurde zunächst mit einer Saponinlösung in 3:2-Puffer mit bzw. ohne 6 mM ATP und 80 nM Phalloidin für 10 min permeabilisiert, bevor die Zellen gewaschen und für 30 min im Brutschrank inkubiert wurden. Die 30-minütige Inkubation sollte der Regeneration der Zellen dienen. Anschließend wurde eine 100 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 Lösung in DMEM zu den Zellen gegeben und die Messung der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 15 min gestartet. Die verwendeten HEK293-CXCR1-Zellen zeigen im

Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten keinen charakteristischen Anstieg der Aktinpolymerisation innerhalb der ersten 30 - 40 s, sondern eine deutlich verzögerte Aktinpolymerisation, die meist zwischen 10 und 60 min messbar war.<sup>[248,249]</sup> Die IL-8 Konzentration wurde entsprechend der Ergebnissen des Transwellassays für HEK293-Zellen gewählt (Kapitel 5.1.2). Als Negativkontrolle wurde zu den ansonsten identisch behandelten Zellen reines DMEM statt IL-8 Lösung hinzugegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.23 dargestellt.

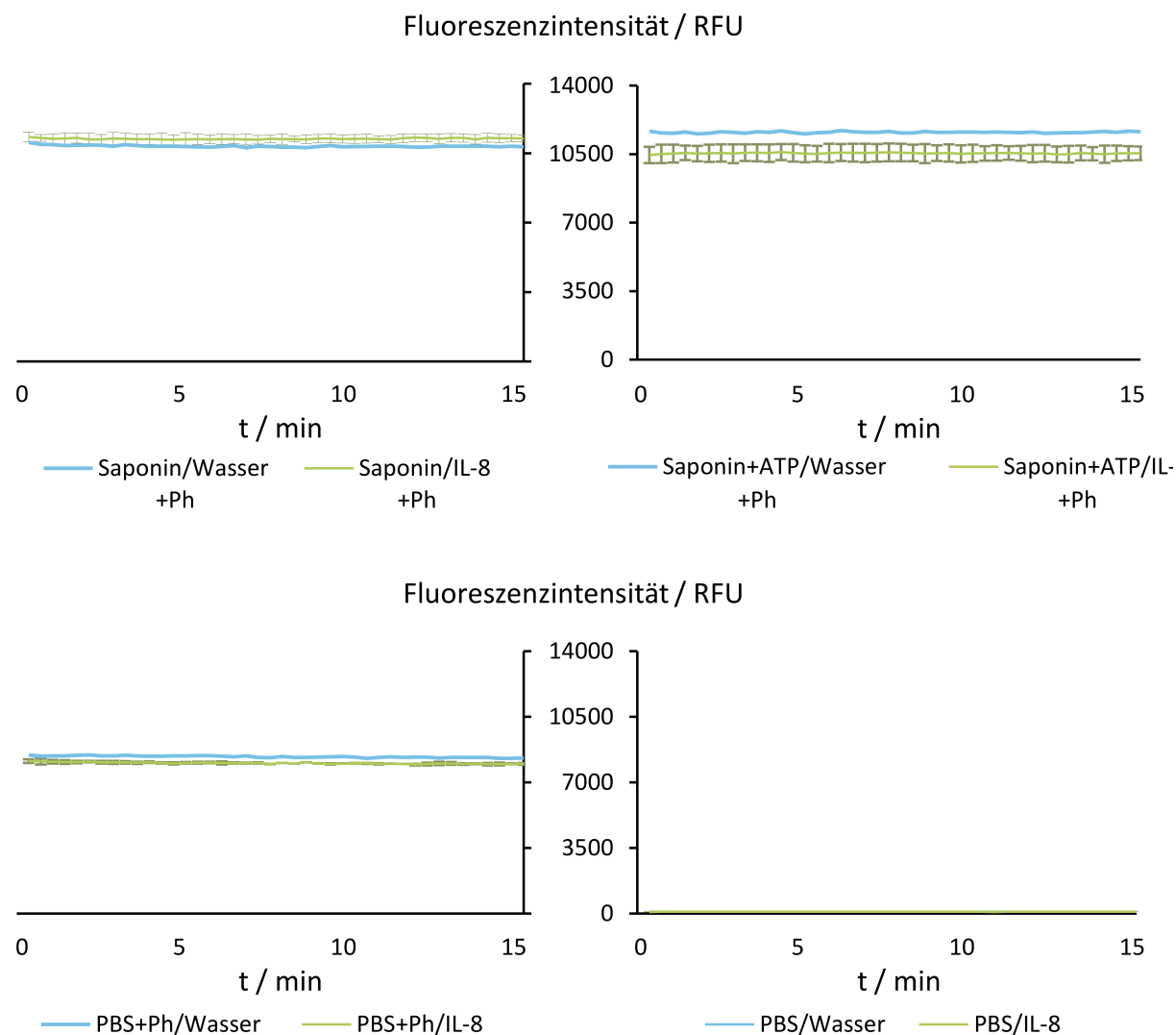


**Abbildung 5.23:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto488 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen. 1. Schritt: 10 min Permeabilisierung der Zellen mit  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin mit und ohne 6 mM ATP und 80 nM Phalloidin-Atto488. 2. Schritt: Waschen der Zellen und Regeneration für 30 min im Brutschrank. 3. Schritt: Aktivierung der Zellen mit  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 in DMEM und anschließende Messung der Fluoreszenzintensität für 15 min. Links oben: Zellen wurden mit Saponin und Phalloidin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. DMEM aktiviert. Rechts oben: Zellen wurden mit Saponin/ATP und Phalloidin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. DMEM aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS), jedoch mit Phalloidin behandelt, und mit IL-8 bzw. DMEM aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. DMEM aktiviert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.

---

Es war kein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit zu beobachten und alle Messpunkte der Positiv- (+IL-8) und Negativkontrollen (-IL-8) lagen auf etwa gleichem Level. Es zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den mit und ohne Saponin behandelten Zellen, in denen sich die Fluoreszenzintensitäten deutlich unterschieden. Somit konnte zumindest eindeutig gezeigt werden, dass Phalloidin durch die Permeabilisierung in die Zelle gelangt, was bei den nicht permeabilisierten Zellen nicht der Fall war (Abbildung 5.23, links unten). Diese zeigten eine vergleichbare Fluoreszenzintensität zu den nicht permeabilisierten und nicht mit Phalloidin behandelten Zellen (Abbildung 5.23, rechts unten). Phalloidin greift in das Aktinpolymerisationsgleichgewicht der Zelle ein und verschiebt es hin zu F-Aktin. Durch die 30-minütige Inkubation im Brutschrank, während der bereits Phalloidin in den Zellen vorhanden war, wurde vermutlich das Gleichgewicht schon zu F-Aktin hin verschoben, sodass die IL-8 Aktivierung entweder keinen Einfluss auf die Aktinpolymerisation nehmen konnte oder kein Unterschied messbar war, da Phalloidin bereits gebunden war. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt auf die Inkubationszeit im Brutschrank verzichtet und direkt nach der Permeabilisierung eine Aktivierung mit IL-8 durchgeführt. Diese Änderung führte jedoch zu keinem Anstieg der Fluoreszenzintensitäten und somit auch zu keinem messbaren Ergebnis. Auch an dieser Stelle schien somit bereits das Gleichgewicht des Aktins eingestellt zu sein. Daraus folgte, dass Phalloidin und IL-8 gleichzeitig zu den Zellen hinzugegeben werden mussten, damit sich das Gleichgewicht nicht vor der Zugabe von IL-8 einstellen konnte. Darüber hinaus erfolgte die Messung mit einer optimierten Z-Position direkt in der Zellebene, um möglichst nur die Fluoreszenzintensität der Zellen und nicht die der Lösung, in der sich fluoreszierendes Phalloidin befindet, zu detektieren. Es stellte sich außerdem heraus, dass DMEM mit Phenolrot eine hohe Eigenfluoreszenz im grünen Kanal aufweist und dadurch auch die nicht mit Phalloidin behandelten Zellen relativ hohe Fluoreszenzintensitäten mit Werten über 20000 RFU zeigten. Die IL-8 Lösungen wurden ab diesem Zeitpunkt in Wasser und nicht mehr in DMEM angefertigt. Die erhaltenen Diagramme sind in Abbildung 5.24 dargestellt.

Auf den ersten Blick wird sichtbar, dass durch diese Veränderung die Hintergrundfluoreszenz der nicht behandelten Zellen im grünen Kanal nahezu vollständig eliminiert werden konnte. Zum ersten Mal gibt es eine eindeutige Korrelation zwischen den mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin behandelten Zellen und der Fluoreszenzintensität. Nicht mit Phalloidin behandelte Zellen zeigten keine Fluoreszenz, wohingegen die Zellen ohne Saponin aber mit Phalloidin Werte von ca. 8000 RFU zeigten. Da bei dieser Durchführung die Phalloidinlösung vor der Messung nicht abgenommen wurde, sondern lediglich die Messung innerhalb der Zellebene stattfand, war es nicht verwunderlich, dass eine gewisse Fluoreszenz der Lösung im Fall der nicht permeabilisierten Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 5.23, links unten). Jedoch zeigten die mit Saponin bzw. Saponin/ATP permeabilisierten Zellen eine deutlich höhere Intensität mit Werten über 11000 RFU. Absolut gesehen waren die Fluoreszenzintensitäten aber deutlich niedriger als in den vorherigen Versuchen, in denen die Werte bei über 40000 RFU gelegen hatten. Weiterhin konnte auch in diesem Fall kein Anstieg der Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von IL-8 beobachtet werden. Problematisch war vermutlich die Zugabe aller Reagenzien zum gleichen Zeitpunkt, wodurch mehrere Reaktionen gleichzeitig ablaufen. Zum einen werden die Zellen permeabilisiert und Phalloidin strömt in die Zelle ein. Zum anderen findet eine Aktivierung durch IL-8 statt, die zu Aktinpolymerisation führen soll. Phalloidin und die IL-8 Aktivierung führen beide zur Aktinpolymerisation und stehen somit in Konkurrenz zueinander.



**Abbildung 5.24:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 538 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto488 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen. Permeabilisierung mit Saponin bzw. Saponin/ATP und Aktivierung wurde simultan durchgeführt. Es wurden  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin mit und ohne  $6 \text{ mM}$  ATP und  $80 \text{ nM}$  Phalloidin-Atto488 verwendet. Aktivierung der Zellen mit  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 in DMEM und anschließende Messung der Fluoreszenzintensität für 15 min. Links oben: Zellen wurden mit Saponin und Phalloidin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Rechts oben: Zellen wurden mit Saponin/ATP und Phalloidin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS), jedoch mit Phalloidin behandelt, und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.

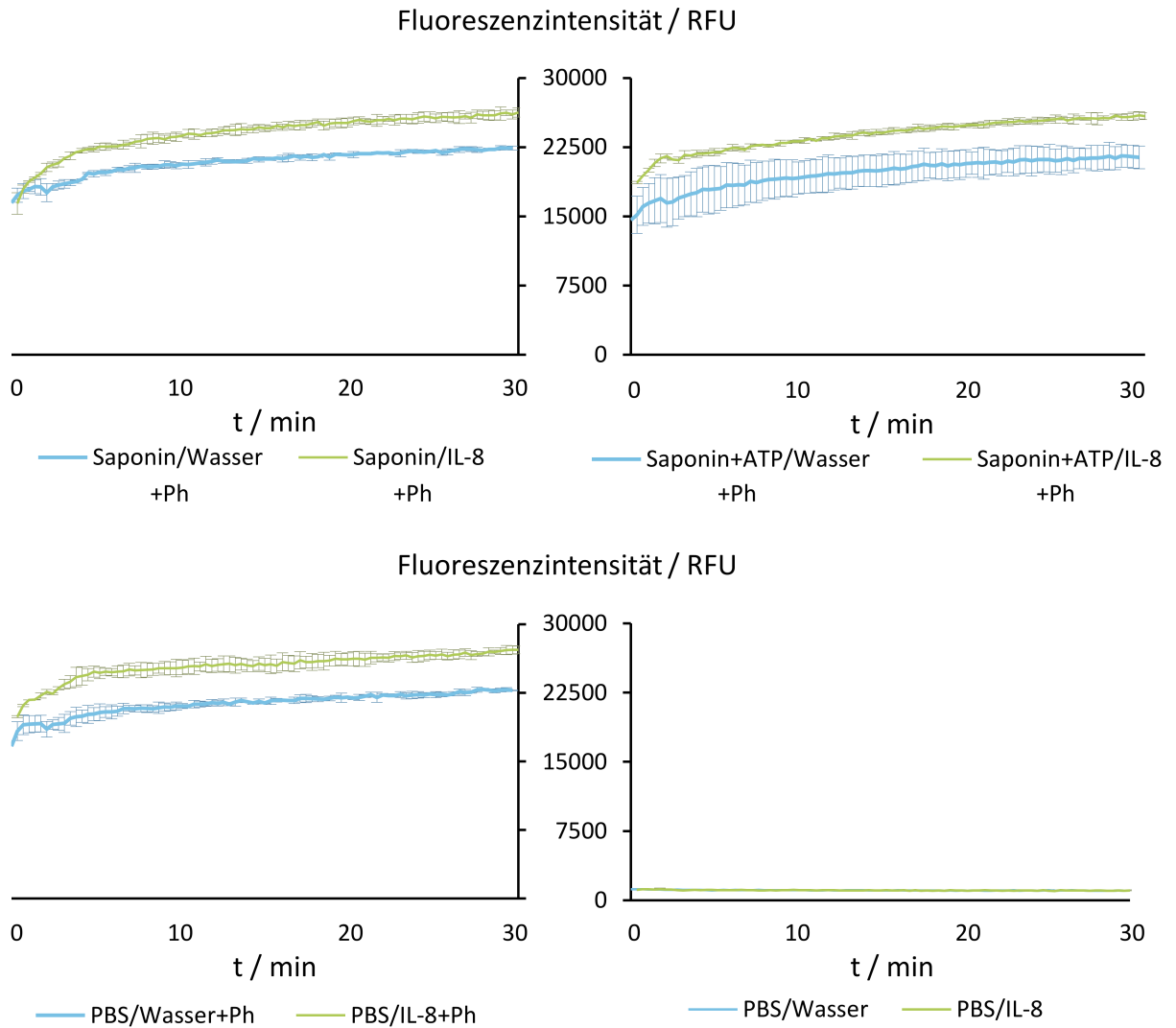
---

Daher wurden die Reaktionen wieder zum Teil voneinander getrennt. Die Zellen sollten erst mit Saponin bzw. Saponin/ATP in 3:2-Puffer permeabilisiert werden, bevor die Aktivierungslösung hinzugegeben wurde, die sowohl Phalloidin als auch IL-8 enthielt. Somit konnte die IL-8 induzierte Aktinpolymerisation beginnen und das gleichzeitig in die Zelle strömende Phalloidin konnte das neu gebildete F-Aktin binden. Auch bei diesem Versuchsaufbau verblieb Phalloidin während der Messung in der Lösung, da die Aktivierungslösung hinzugegeben wurde, ohne vorher einen Waschschrift mit den Zellen durchzuführen. Die Saponinkonzentration wird dabei durch Zugabe der Aktivierungslösung von 75 auf  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  herabgesetzt, es ist jedoch während der gesamten Messzeit Saponin in der Lösung enthalten, sodass die Zellen permeabilisiert bleiben und Phalloidin aus der Lösung einströmen kann. Außerdem wurde in diesem Versuch die Phalloidinkonzentration von 80 auf 20 nM verringert, um den Einfluss des Phalloidins auf die Aktinpolymerisation zu verringern. Die zuvor detektierten Fluoreszenzintensitäten waren hoch. Daher konnte die Konzentration herabgesetzt werden, ohne die Detektion zu beeinträchtigen. Weiterhin wurde nun die Fluoreszenzmessung von unten durchgeführt, damit die Detektion nahezu ausschließlich in der Zellschicht erfolgte. Dadurch sollte es möglich sein, den Einfluss der Fluoreszenz der Lösung zu verringern, sodass die überstehende Lösung nicht entfernt werden musste. Die veränderte Versuchsdurchführung lieferte die in Abbildung 5.25 dargestellten Ergebnisse.

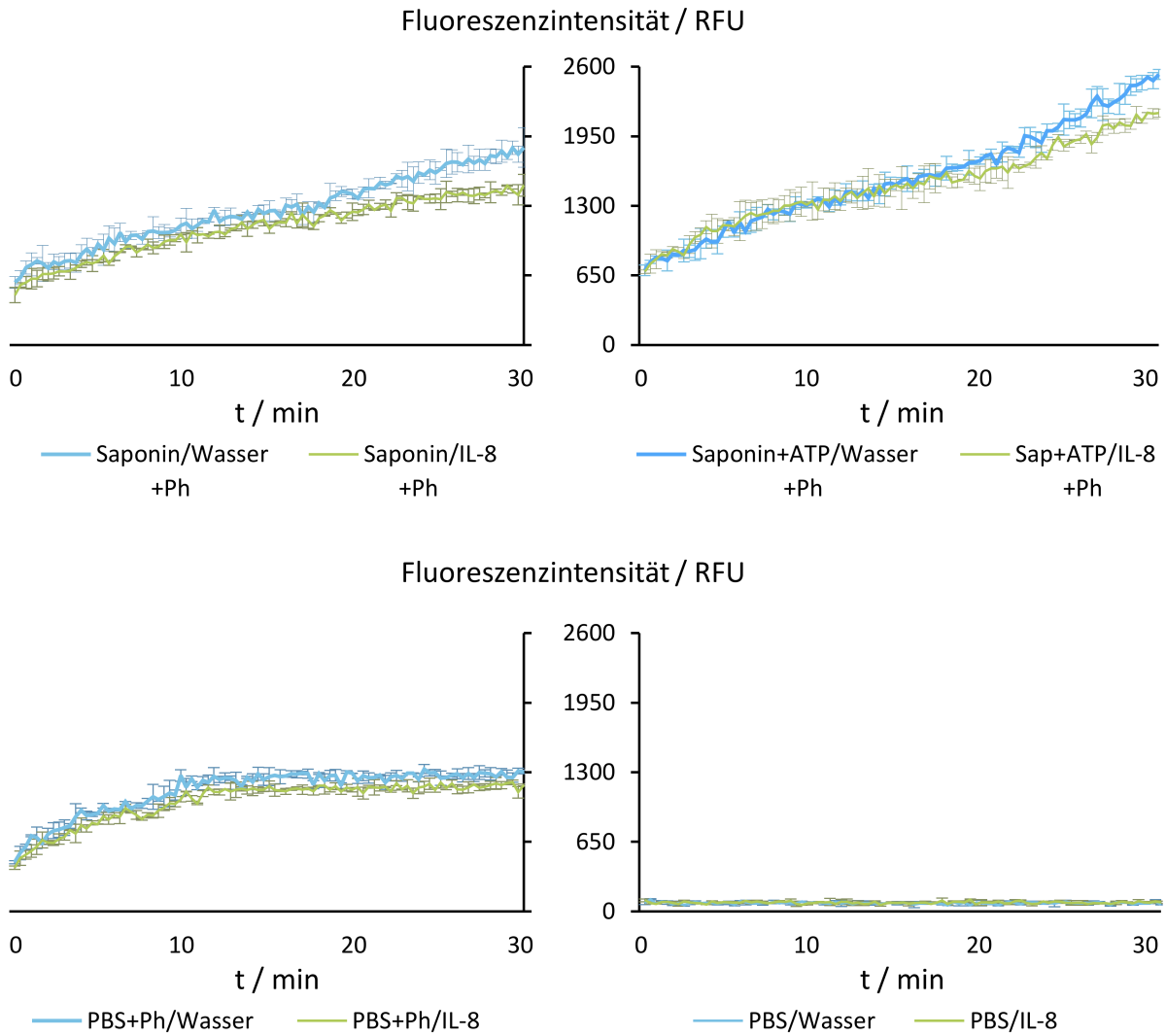
Mit diesem Versuchsaufbau war zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenzintensität über die Zeit zu beobachten, der in eine Sättigung überging. Dabei war dieser nicht nur auf die Zugabe von IL-8 zu den Zellen beschränkt, sondern zeigte sich bei allen mit Phalloidin behandelten Zellen. Auch bei den Zellen, die zuvor nicht mit Saponin permeabilisiert wurden, zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Phalloidin. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Phalloidin zum Teil auch ohne Permeabilisierung in die Zelle gelangt. Eine weitere Erklärung wäre, dass Phalloidin an der Zellmembran unspezifisch bindet und somit die Fluoreszenzintensität erhöht. Bei den permeabilisierten Zellen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen IL-8 aktivierten und nicht aktivierten Zellen beobachtet werden und es schien tatsächlich möglich zu sein, Aktinpolymerisation in lebenden Zellen zu detektieren. Es wurde erneut die Phalloidinkonzentration verringert, da die absoluten Fluoreszenzintensitäten immer noch hoch genug waren und Phalloidin weiterhin die Aktinpolymerisation zu beeinflussen schien, wie anhand der Steigung der Fluoreszenzintensität der nicht aktivierten Zellen sichtbar. Es wurde eine Konzentration von 5 nM gewählt. Um Störungen durch Autofluoreszenz im grünen Kanal zu umgehen, die bei niedrigen Fluorophorkonzentrationen stärker ins Gewicht fallen, wurde ab diesem Punkt mit einem anderen Phalloidinkonjugat, Atto565, gearbeitet, das im orangen Kanal fluoresziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.26 dargestellt.

Es konnte ein Unterschied zu den vorherigen Messungen beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität der mit Saponin und Saponin/ATP permeabilisierten Zellen ging im Gegensatz zu den nicht permeabilisierten Zellen nicht in eine Sättigung über, sondern stieg näherungsweise linear an. Dabei waren die Werte der Fluoreszenzintensität der IL-8 behandelten Zellen im Vergleich zu nicht IL-8 stimulierten Zellen etwas höher und auch wiesen die mit Saponin/ATP und IL-8 behandelten Zellen etwas höhere Werte auf. Die Phalloidinkonzentration war demnach ein kritischer Faktor bei der Entwicklung des Assays, da 5 nM im Gegensatz zu den vorher verwendeten 20 nM zu einem





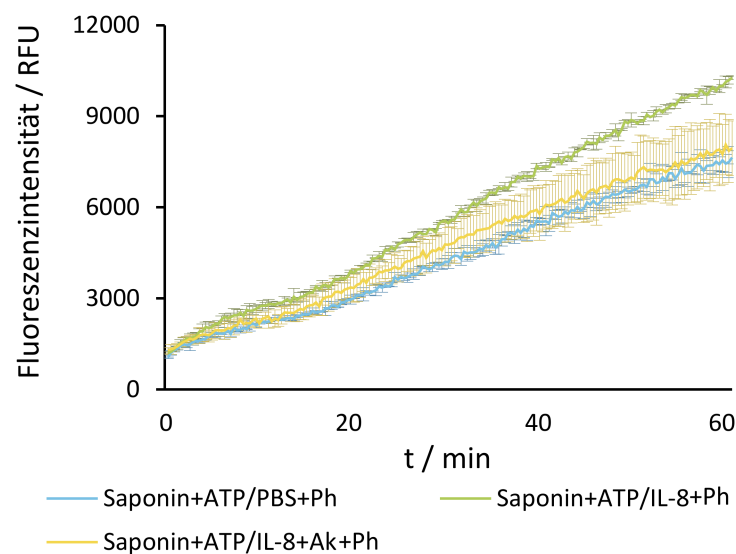
**Abbildung 5.25:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 538 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto488 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen nach 10 min Permeabilisierung mit Saponin bzw. Saponin/ATP und anschließender Aktivierung mit  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 und Phalloidin-Atto488 in Wasser. Die Messung wurde direkt nach Zugabe der Aktivierungslösung gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von 30 min. Phalloidin-Atto488 Konzentration:  $20 \text{ nM}$ . Saponinkonzentration:  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ATP:  $6 \text{ mM}$ . Links oben: Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts oben: Zellen wurden mit Saponin/ATP permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.



**Abbildung 5.26:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 563 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 592 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto565 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen nach 10 min Permeabilisierung mit Saponin bzw. Saponin/ATP und anschließender Aktivierung mit  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 und Phalloidin-Atto565 in Wasser. Die Messung wurde direkt nach Zugabe der Aktivierungslösung gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von 30 min. Phalloidin-Atto565 Konzentration:  $5 \text{ nM}$ . Saponinkonzentration:  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . ATP:  $6 \text{ mM}$ . Links oben: Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts oben: Zellen wurden mit Saponin/ATP permeabilisiert und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. Wasser und Phalloidin aktiviert. Rechts unten: Zellen wurden nicht permeabilisiert (PBS) und mit IL-8 bzw. Wasser aktiviert. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.

anderen Kurvenverlauf führten. Weitere Versuche bestätigten die positive Wirkung von ATP auf die Permeabilisierung der Zellen. In allen Folgeversuchen wurden daher 6 mM ATP zugesetzt.

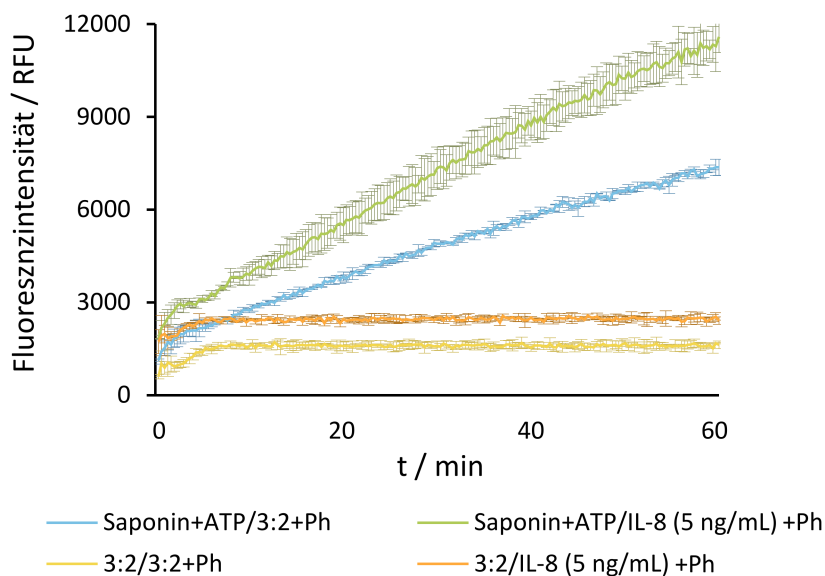
Da jedoch weiterhin der Unterschied zwischen mit IL-8 behandelten und unbehandelten Zellen sehr gering war, wurde die Abhängigkeit der Aktinpolymerisation von der IL-8 Konzentration getestet. Dabei wurden folgende Konzentrationen verwendet: 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 500 ng mL<sup>-1</sup>. Eine Konzentration von 5 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 zeigte die höchsten Werte und wurde für weitere Versuche eingesetzt. Um das erhöhte Signal bei den mit IL-8 behandelten Zellen auf spezifische IL-8 induzierte Aktinpolymerisation zurückführen zu können, wurde eine Antikörperkontrolle mit anti-IL-8 durchgeführt (Abbildung 5.27). Außerdem wurde die Messzeit von 30 auf 60 min erhöht, um größere Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen mit IL-8 behandelten und unbehandelten Zellen nach verlängerter Zeit zu erhalten.



**Abbildung 5.27:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 563 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 592 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto565 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen nach 10 min Permeabilisierung mit Saponin bzw. Saponin/ATP und anschließender Aktivierung mit 5 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 in Wasser (grün) bzw. 5 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 + 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  anti-IL-8 Antikörper (gelb) und Phalloidin-Atto565 in Wasser. Die Messung wurde direkt nach Zugabe der Aktivierungslösung gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Phalloidin-Atto565 Konzentration: 5 nM. Saponinkonzentration: 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . ATP: 6 mM. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben. Die Kontrollen mit nicht permeabilisierten Zellen sind nicht dargestellt, da sie sich nicht von denen aus Abbildung 5.26 unterschieden.

Dieser Versuch ergab eine erhöhte Fluoreszenzintensität für die permeabilisierten und mit IL-8 behandelten Zellen, die bei Zusatz des anti-IL-8 Antikörpers herabgesetzt wurde. Dabei waren die Standardabweichungen in der Antikörperkontrolle deutlich größer als die der IL-8 Positivkontrolle. Die Intensitäten von Negativ- (permeabilisierte Zellen ohne IL-8) und Antikörperkontrolle waren vergleichbar. Das beobachtete Signal ist somit eindeutig auf IL-8 zurückzuführen. Problematisch waren jedoch immer noch die geringen Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle. Die hohen Werte der Negativkontrolle waren auf die durch Phalloidin induzierte Aktinpolymerisation zurückzuführen. Um diesen Unterschied zu vergrößern, wurde erneut eine Optimierung der Parameter durchgeführt. Dabei wurde zum einen das PBS der Negativkontrolle durch 3:2-Puffer ersetzt und

dementsprechend wurden auch die Verdünnungen der Aktivierungslösungen in 3:2-Puffer angefertigt, sodass der 3:2-Puffer der Permeabilisierungslösung nicht durch Zugabe der Aktivierungslösung in PBS verdünnt und dadurch der osmotische Druck verringert wurde. Dadurch könnte der Einstrom des Phalloidins in die Zelle während der Messung zusätzlich begünstigt werden und so zu einer Erhöhung des Signals und der Signaldifferenz führen. Außerdem wurde die Permeabilisierungszeit auf 5 min reduziert und die Phalloidinkonzentration auf 6 nM erhöht, um die dynamische Breite zu erhöhen. Das Ergebnis der Optimierung ist in Abbildung 5.28 dargestellt.



**Abbildung 5.28:** Zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 563 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 592 \text{ nm}$ ) des Phalloidin-Atto565 während der Aktinpolymerisation in HEK293-CXCR1-Zellen nach 5 min Permeabilisierung mit Saponin bzw. Saponin/ATP und anschließender Aktivierung mit  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 und Phalloidin-Atto565 in 3:2-Puffer. Die Messung wurde direkt nach Zugabe der Aktivierungslösung gestartet und erfolgte über einen Zeitraum von 60 min. Phalloidin-Atto565 Konzentration:  $6 \text{ nM}$ . Saponinkonzentration:  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.

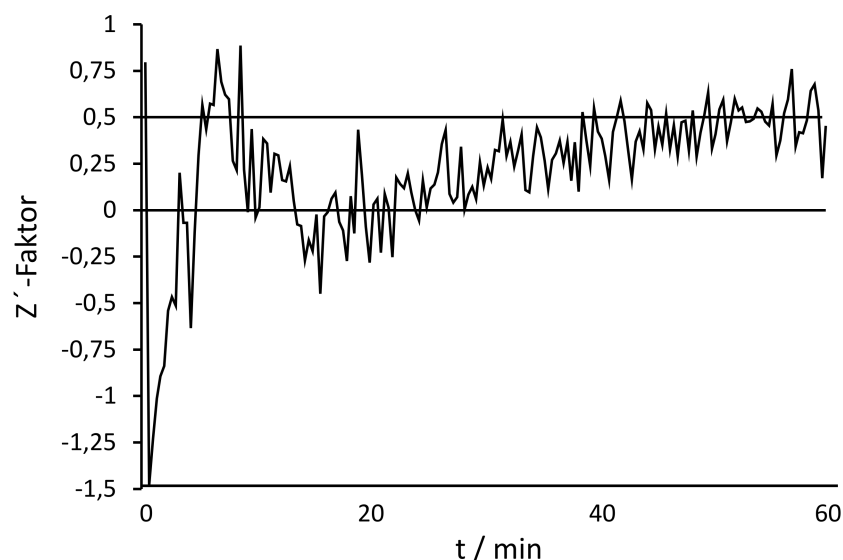
Die charakteristischen Verläufe bei den permeabilisierten Zellen waren weiterhin zu beobachten, jedoch zeigten die mit Saponin/ATP permeabilisierten und anschließend mit IL-8 aktivierten Zellen im Gegensatz zu den nicht aktivierten Zellen einen deutlich steileren Anstieg der Fluoreszenzintensität, der auf eine IL-8 induzierte Aktinpolymerisation zurückzuführen ist. Dieser Versuch ergab erstmals Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrolle, die sensitiv genug für die Charakterisierung von Inhibitoren und ausreichend groß für ein *High-Throughput Screening* sein könnten. Die Zugabe der Aktivierungslösungen in 3:2-Puffer hatte einen positiven Einfluss, da dadurch weiterhin eine hypotonische Umgebung um die Zellen herrschte und somit weiterhin das Phalloidin besser in die Zellen gelangen konnte.

Zhang *et al.* beschreibt eine dimensionslose, statistische Größe, den sogenannten  $Z'$ -Faktor, mit dessen Hilfe die Eignung eines Assay im HTS-Format überprüft werden kann. Der  $Z'$ -Faktor kann

durch den Quotienten der Breite der Summe der  $3\sigma$ -Intervalle und der dynamischen Breite ermittelt werden (Formel (5.1)).<sup>[250]</sup>

$$Z' \text{-Faktor} = 1 - \frac{3\sigma_{\max} + 3\sigma_{\min}}{|\mu_{\max} - \mu_{\min}|} \quad (5.1)$$

Dabei steht  $\mu$  für den Mittelwert der jeweiligen Probe und  $\sigma$  gibt die Standardabweichung dieses Mittelwerts an. Es wird sowohl die dynamische Breite des Assays als auch die Streuung von Positiv- und Negativkontrolle berücksichtigt. Je höher der Wert des  $Z'$ -Faktors für einen Assay, umso besser ist die Datenqualität und die Eignung des Assays für ein HTS-Format. Ein exzellenter Assay zeichnet sich durch einen  $Z'$ -Faktor zwischen 0,5 und 1 aus. Bei Verwendung von Positiv- und Negativkontrolle kann dieser Faktor zur Etablierung und Optimierung eines Assays herangezogen werden.<sup>[250]</sup> Für die in Abbildung 5.28 dargestellte Negativ- (permeabilisierte Zellen ohne IL-8 Stimulierung) und Positivkontrolle (permeabilisierte Zellen mit IL-8 Stimulierung) wurde der  $Z'$ -Faktor für alle Messpunkte berechnet und in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 5.29).

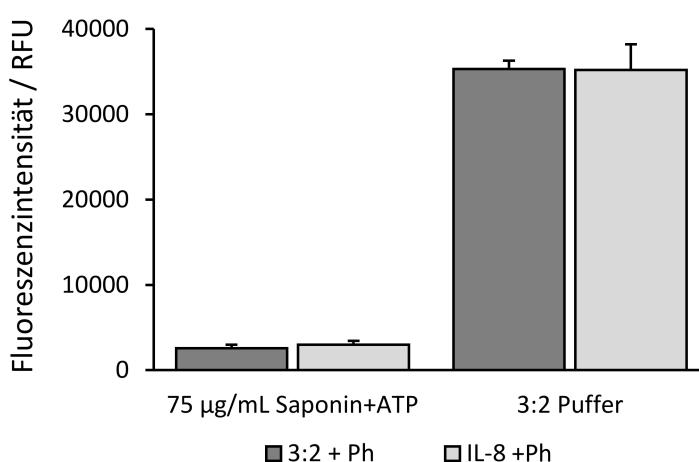


**Abbildung 5.29:** Zeitaufgelöster  $Z'$ -Faktor bestimmt aus den Mittelwerten und Standardabweichungen der IL-8 Positiv- (grün) und der Negativkontrolle (blau) der in Abbildung 5.28 dargestellten Ergebnisse. Als Negativkontrolle wurden mit Phalloidin/ATP permeabilisierte Zellen ohne IL-8 Stimulierung verwendet. Als Positivkontrolle wurden mit Phalloidin/ATP permeabilisierte Zellen mit anschließender IL-8 Stimulierung verwendet.

Anfangs sind Werte kleiner Null zu beobachten, die durch die Überschneidung der  $3\sigma$ -Intervalle der Positiv- und Negativkontrolle entstehen und bedeuten, dass keine Aussage über eine IL-8 induzierte Aktinpolymerisation möglich ist. Da zu Beginn der Messung beide Werte im gleichen Punkt starteten, brauchte es einige Zeit, bis sich die beiden Kurven ausreichend weit voneinander separierten. Dies konnte anhand der anfänglich negativen Werte des  $Z'$ -Faktors beobachtet werden. Der  $Z'$ -Faktor steigt jedoch innerhalb der ersten 5 min bis über 0,8 stark an, sinkt danach auf unter 0 und schwankt die letzten 30 min der Messung um einen Wert von 0,5. Bei der Verwendung von HEK293-Zellen zur

Untersuchung der Aktinpolymerisation ist nicht wie bei Neutrophilen ein starker Anstieg innerhalb der ersten 30 - 40 s charakteristisch, sondern die Aktinpolymerisation wird üblicherweise nach 10 min bis 1 h betrachtet.<sup>[248,249]</sup> Nach einer 10-minütigen Stimulierung der Zellen mit IL-8 waren die ersten Werte des Z'-Faktors oberhalb von 0,5 zu beobachten. Da er jedoch danach schnell abfiel und erst ab 18 min weiter anstieg bis er nach 30 min relativ konstant bei einem Wert von 0,5 lag, ist der Z'-Faktor nach 30 min stabiler und sollte daher verwendet werden. Die starken Schwankungen sind dadurch zu erklären, dass nur eine Zweifachbestimmung durchgeführt wurde und die Werte somit deutlich fehleranfälliger sind. Bei der Verwendung von drei oder mehr Bestimmungen würden die Schwankungen kleiner und der Wert genauer. Dennoch liefern diese Daten die Information, dass dieser Assay prinzipiell HTS geeignet ist, denn er zeigt einen ausreichenden Z'-Faktor größer 0,5.

Mit den Zellen der in Abbildung 5.28 dargestellten Ergebnisse wurde ein Viabilitätstest mit Resazurin durchgeführt (Abbildung 5.30).



**Abbildung 5.30:** Viabilitätstest mit Resazurin nach Durchführung eines Aktinpolymerisationsassays in lebenden Zellen. Messung der Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) umgesetzt durch die HEK293-CXCR1-Zellen. Die Zellen wurden wie in Abbildung 5.28 beschrieben behandelt. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ ) angegeben.

Die mit  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin/ATP permeabilisierten Zellen waren nach einer Stunde Messzeit nahezu vollständig abgestorben. Die mit reinem 3:2-Puffer behandelten Zellen hingegen blieben vital. Somit war das Absterben der Zellen auf die Saponinkonzentration zurückzuführen. Da die Permeabilisierungslösung durch Zugabe der Aktivierungslösung nur verdünnt und nicht entfernt wurde, verblieb weiterhin  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin während der einstündigen Messung in der Lösung. Diese Konzentration war offenbar zu hoch und die Zellen starben. Der zu beobachtende Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen Negativ- und Positivkontrolle wurde somit zwar von der IL-8 Aktivierung ausgelöst, doch die Aktinpolymerisation wurde, vermutlich durch das weiter einströmende Phalloidin, weiter vorangetrieben. Trotz des Absterbens der Zellen wurde keine Sättigung der Fluoreszenzintensität erreicht, sodass entweder weiterhin G-Aktin in der Zelle vorhanden war oder Phalloidin an weitere Zellbestandteile assoziiert.

Es folgten verschiedene Versuche zur Optimierung der Parameter. Dabei sollte eine möglichst große Signaldifferenz zwischen den Signalen der Positiv- und Negativkontrolle erhalten werden, während die Zellviabilität möglichst erhalten bleiben sollte. Der Versuch, die Saponinkonzentration auf 25,

---

50 oder  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin herabzusetzen, zeigte keine signifikanten Unterschiede der Signale mit und ohne IL-8 Aktivierung. Dabei waren die beiden Konzentrationen von 25 und  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  über den Messzeitraum von einer Stunde nicht toxisch, die von  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  hingegen schon. Die nächste Maßnahme bestand darin, nach erfolgter Permeabilisierung mit verschiedenen Saponinkonzentrationen ( $50$  bis  $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ) die Saponinlösung abzunehmen und anschließend die Aktivierungslösung zu den Zellen zu geben. Auch hier konnte keine IL-8 induzierte Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die Poren der Membran scheinen sich relativ schnell wieder zu schließen, sodass die Einbringung einer Substanz nur in Anwesenheit des Permeabilisierungsreagenz möglich ist. Deshalb wurde versucht, mit einer  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponinlösung zu permeabilisieren und ohne Abnahme der Lösung mit IL-8 zu aktivieren. Dadurch könnten mehr Poren in der Membran entstehen und es gelangt innerhalb einer kürzeren Zeitspanne mehr Phalloidin in die Zelle, die das IL-8 induzierte Signal nach deutlich weniger als einer Stunde nachweisen kann. Die Zellen waren über einen kürzeren Zeitraum Saponin ausgesetzt und sollten daher vitaler sein. Leider konnte auch mit diesem Versuchsaufbau kein Unterschied bei der Probe mit IL-8 beobachtet werden.

Es war somit nicht möglich, ein IL-8 induziertes Signal in HEK293-CXCR1 mit ausreichendem  $Z'$ -Faktor zum HTS zu erhalten und gleichzeitig die Viabilität der Zellen sicherzustellen. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob dies überhaupt notwendig ist. Es sollte ein *High-Throughput Screening* zum Test von Inhibitoren entwickelt werden. Dazu muss der  $Z'$ -Faktor ausreichend sein, aber die Viabilität der Zellen am Ende des Assays beeinträchtigt die erhaltenen Ergebnisse nicht, solange sie zu Beginn vital sind, was bereits zu Beginn dieses Kapitels gezeigt wurde. Die Kontrollen haben gezeigt, dass die Signaldifferenz spezifisch auf IL-8 zurückzuführen ist. Somit konnte unter der Verwendung einer Permeabilisierungslösung, die  $75\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin und 6 mM ATP in 3:2-Puffer enthält, nach einer Permeabilisierungszeit von 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und einer anschließenden Aktivierung mit  $5\text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 in 3:2-Puffer erfolgreich die Aktinpolymerisation in lebenden Zellen nachgewiesen werden.

Da Chemokine *in vivo* primär auf Immunzellen wirken und diese *per se* Chemokinrezeptoren exprimieren, wäre eine Übertragung des Assays auf diese Zellen von großem Interesse, um auch weitere Chemokine und deren Inhibitoren testen zu können. Erste Versuche zeigten, dass Saponin eine sehr unterschiedliche Wirkung auf neutrophile Granulozyten und die Monozytenzelllinie THP-1 hat, denn diese Zellen sind kleiner als HEK293-Zellen und außerdem Suspensionszellen. Das Oberflächen zu Volumen Verhältnis ist demnach deutlich größer und Saponin kann von allen Seiten angreifen, wohingegen bei HEK293-Zellen ausschließlich der Angriff von oben erfolgen kann. Aufgrund der größeren Angriffsfläche für Saponin bei gleichbleibender Konzentration wäre zu erwarten gewesen, dass höhere Saponinkonzentrationen weniger toxisch wirken und dieser Effekt konnte auch beobachtet werden. Selbst eine zehnminütige Inkubation der Immunzellen in  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin führte kaum zur Beeinträchtigung der Zellviabilität. Jedoch gestaltete es sich deutlich schwieriger, ausreichende Mengen von Phalloidin in die Zellen hineinzubringen. Trotz höherer Saponinkonzentrationen waren die resultierenden Fluoreszenzintensitäten deutlich geringer als die bei den HEK293-CXCR1. Durch ihre geringer Größe im Vergleich zu den HEK293-Zellen ist es vermutlich auch schwieriger, die Fluoreszenzintensität in der Zellebene zu detektieren. Für diese Zellen bedarf es offenbar einer Anpassung der Parameter.

---

### 5.3 Chemotaxis an Einzelzellen

---

Um den Mechanismus der Chemotaxis und Haptotaxis weiter aufzuklären, sind entsprechende Assays notwendig, die die Untersuchung auf Einzelzellebene erlauben. Dabei stellen der Einfluss der Steilheit des Gradienten, der Oberflächenbeladung und der Art der Immobilisierung des Chemoattraktanten wichtige Aspekte dar. Dazu wird ein experimentelles Setup benötigt, mit dem definierte und reproduzierbare Gradienten von Chemokinen erhalten werden, die von den Zellen erkannt werden. Es gibt zahlreiche Assays für die Chemotaxis von Leukozyten in Antwort auf einen löslichen Chemoattraktantgradienten.<sup>[94,123,173,178]</sup> Es sollte ein solcher Assay in mikrofluidischen Kanälen etabliert werden, um Einzelzelluntersuchungen in löslichen Gradienten durchführen zu können. *In vivo* findet die Migration der Immunzellen auf dem Endothel statt, auf welchem Chemokingradienten über Glykosaminoglykane immobilisiert vorliegen. Um diesen Prozess zu analysieren und nachzuahmen, ist ein Assay für Migration auf oberflächengebundenem Chemokingradienten notwendig. Vorangegangene Arbeiten mit Liniengradienten haben gezeigt, dass eine örtlich sehr feine Auflösung des Gradienten für die Erkennung durch Zellen benötigt wird, die nur durch einen kontinuierlichen Gradienten realisiert werden kann.<sup>[251]</sup> Somit musste eine Strategie entwickelt werden, mit der ein kontinuierlicher Chemokingradient gebildet und auf einer Oberfläche immobilisiert werden kann. Durch die Verwendung von Hydrogelen können diffusionsbasiert kontinuierliche Proteingradienten erzeugt werden.<sup>[202]</sup> Diese Strategie sollte verwendet werden, um einen Haptotaxisassay auf Oberflächen zu entwickeln.

---

#### 5.3.1 Mikrofluidische Kanäle zur Untersuchung von Chemotaxis

---

Die Erzeugung von Gradienten in mikrofluidischen Systemen bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber den klassischen Systemen wie der Boyden-Kammer<sup>[173]</sup> oder auch der Gradientenbildung durch Diffusion in Hydrogelen<sup>[202,217]</sup>. Zum einen können definierte und über Zeit und Raum stabile Gradienten erzeugt werden, was mit den meisten anderen Systemen nicht möglich ist. Zum anderen ist die Erzeugung kontinuierlicher Gradienten möglich, die je nach Aufbau nahezu jede Form annehmen können.<sup>[176,178]</sup> Die Verwendung eines „Y“-Typs stellt dabei den einfachsten Aufbau dar, der über zwei Eingänge und einen Ausgang verfügt.<sup>[183]</sup> Ein solcher Aufbau wurde auch in dieser Arbeit für die ersten Versuche gewählt und ist in Abbildung 5.31 dargestellt. Die Herstellung und die Beschichtung der mikrofluidischen Systeme erfolgte durch Dr. Suman Narayan und Asma Siddique, M.Phil. (AK Prof. Dr. Stark, TU Darmstadt). Für die von ihnen zur Verfügung gestellten Kanäle sollten zunächst geeignete Parameter zur Gradientenerzeugung gefunden werden. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen der Master-Thesis von Victoria Engemann durchgeführt.<sup>e</sup>

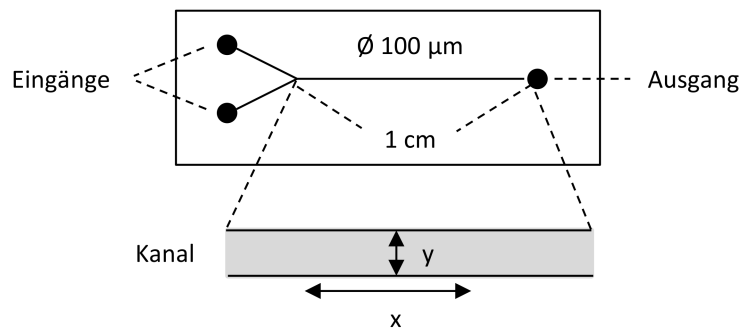
#### Optimierung der Parameter zur Erzeugung von Gradienten

Zu Beginn wurde der in Abbildung 5.31 dargestellte Aufbau verwendet, der eine Kanalbreite von 100  $\mu\text{m}$  aufwies. Es wurden Spritzenpumpen verwendet, damit ein gleichmäßiger Fluss mit einer Flussrate von 0,5  $\mu\text{L min}^{-1}$  im Kanal erzeugt werden konnte. Die ersten Kanäle waren nicht beschichtet und bestanden aus reinem Polydimethylsiloxan (PDMS), das stark hydrophob ist. Dies stellte sich als

---

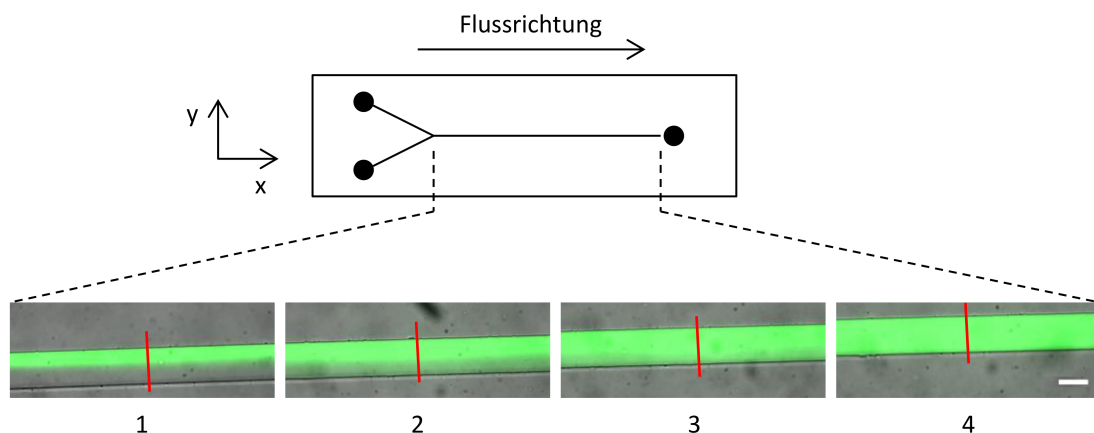
<sup>e</sup> Master-Thesis von Victoria Engemann zum Zeitpunkt der Abgabe noch nicht abgeschlossen.





**Abbildung 5.31:** Mikrofluidischer Kanal im „Y“-Typ bestehend aus Polydimethylsiloxan (PDMS). Er verfügt über zwei Eingänge und einen Ausgang. Der Innendurchmesser des Kanals beträgt  $100\mu\text{m}$  mit einer Kanallänge von ca. 1 cm.

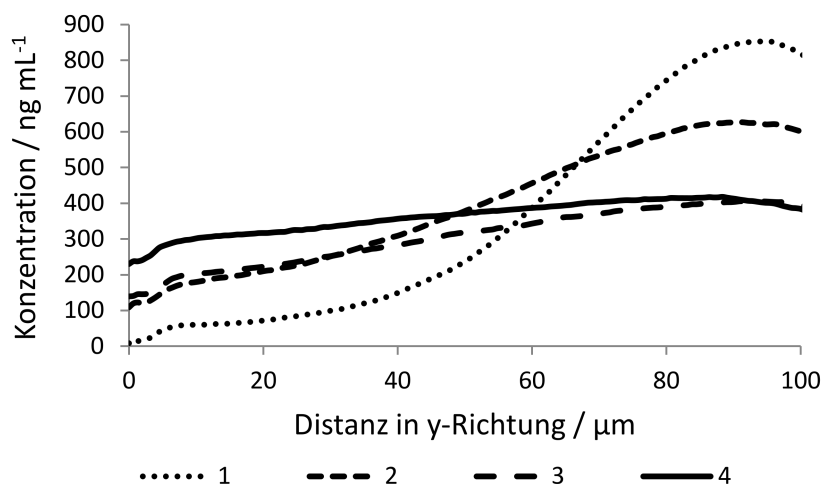
ungeeignet heraus, da die hydrophobe Oberfläche den Fluss in den Kanälen verhinderte. Um dieses Problem zu beheben, wurden die Kanäle mit Rattenkollagen beschichtet. Kollagen ist ein Protein aus der extrazellulären Matrix und sorgt somit nicht nur für eine hydrophile Oberfläche, sondern wirkt ebenfalls als Adhäsionsmolekül für Zellen. Mit kollagenbeschichteten Kanälen konnte ein Gradient in y-Richtung bestehend aus IL-8-S72C-Fluorescein generiert werden (Abbildung 5.32), der nach einer Flusszeit von zunächst 30 min der Lösungen im Kanal mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert und aufgenommen wurde.



**Abbildung 5.32:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des IL-8-S72C-Fluorescein Gradienten im mikrofluidischen Kanal. Der schematisch dargestellte Kanal gibt die ungefähren Positionen der aufgenommenen Bilder an. Über den oberen Eingang wird IL-8-S72C-Fluoresceinlösung in PBS und über den unteren PBS zugeführt. Die Bilder wurden nach 30 min Flusszeit der Lösungen im Kanal aufgenommen. Der rote Strich gibt die Position der Intensitätsprofile an. Vergrößerung: 20x. Maßstab:  $100\mu\text{m}$ .

Im ersten Abschnitt direkt hinter den beiden Eingängen ist mit bloßem Auge eine klare Abtrennung der beiden Flüssigkeiten zu erkennen, die sich im Verlauf des Kanals in x-Richtung mehr und mehr vermischen. Zur Quantifizierung der Gradienten wurden Intensitätsprofile über den Querschnitt des Kanals in y-Richtung (Abbildung 5.32, rote Striche) erzeugt und die aufgenommenen Graustufen wurden direkt in eine Konzentration von IL-8 umgerechnet. Dazu wurde angenommen, dass die Fluoreszenzintensität am oberen Kanalrand des ersten Bildes nahezu der eingesetzten Konzentration von  $840\text{ ng mL}^{-1}$  entsprach. Analog dazu wurde die Fluoreszenzintensität am unteren Kanalrand

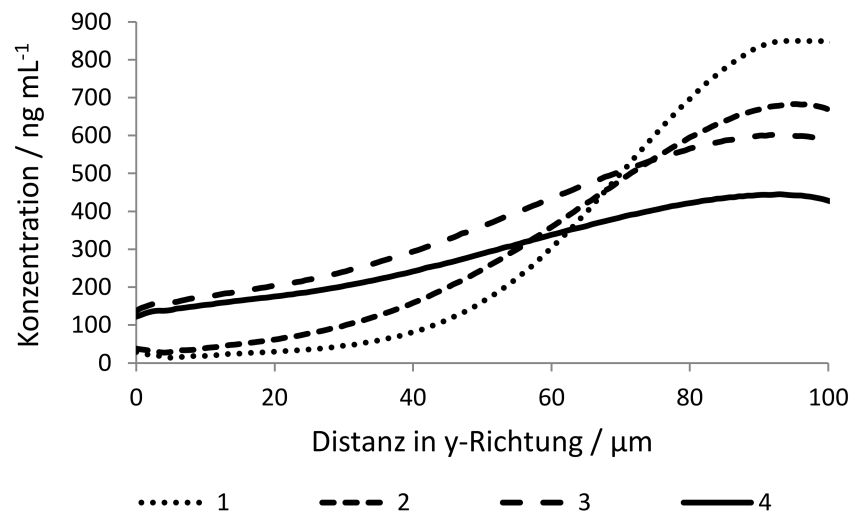
im ersten Bild auf  $0 \text{ ng mL}^{-1}$  IL-8 gesetzt. Unter der Annahme, dass sich die Fluoreszenzintensität bei den gewählten Konzentrationen näherungsweise proportional zur Konzentration verhält, konnte so anhand der Graustufen der Fluoreszenzintensität die Konzentration an IL-8 an jeder beliebigen Stelle im Kanal berechnet werden. Die entsprechenden Profile des Konzentrationsverlaufs gegen den Kanalquerschnitt der nach 30 min Flusszeit erhaltenen Gradienten sind in Abbildung 5.33 dargestellt.



**Abbildung 5.33:** Profile der in Abbildung 5.32 dargestellten Fluoreszenzbilder 1 - 4 des Gradientenverlaufs von IL-8-S72C-Fluorescein nach 30 min über die Distanz in y-Richtung des Kanals (senkrecht zur Flussrichtung). Dabei wurden die Graustufen der Fluoreszenzbilder in die IL-8 Konzentration umgerechnet, indem die maximale Intensität am Eingang des Kanals als eingesetzte IL-8 Konzentration ( $840 \text{ ng mL}^{-1}$ ) angesehen und die am Eingang vorliegende Intensität des PBS als Nullwert verwendet wurde.

Die Betrachtung der Profile bestätigt den Eindruck mit dem bloßem Auge der Fluoreszenzbilder. Die Steigung des Gradienten nimmt mit fortlaufendem Abschnitt im Kanal deutlich ab. Es sind jedoch keine vollständig linearen Steigungen zu beobachten. Die Profile weisen vor allem am Anfang des Kanals eher einen sigmoidalen Verlauf auf. Weiter hinten im Kanal wird der Verlauf flacher und die beiden Lösungen nähern sich dem Konzentrationsmittelwert von  $420 \text{ ng mL}^{-1}$  an, der jedoch nicht vollständig erreicht wird. Um den Einfluss der Flusszeit auf die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zu untersuchen, wurden nach 60 min Flusszeit im Kanal erneut Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop gemacht, die ebenfalls als Profile aufgetragen wurden (Abbildung 5.34). Es ist zu erkennen, dass die Steigung mit der Zeit zunimmt und die Profile mit zunehmender Entfernung von der Verzweigung des Kanals weniger flach verlaufen als nach 30 min. Vor allem an den beiden Positionen 3 und 4 ist die Zunahme der Steigung deutlich. Über den linearen Bereich der Kurvenverläufe lässt sich eine lineare Regression durchführen, anhand derer der Konzentrationsgradient pro Abschnitt bestimmt werden kann. In Tabelle 5.5 sind die entsprechenden mittleren Steigungen der vier Abschnitte nach 30 und 60 min Flusszeit im Kanal dargestellt. Der Gradient weist am Anfang des Kanals, wo beide Lösungen zusammenfließen, die größte Steigung mit  $16,9 \text{ ng mL}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$  (30 min) und  $18,6 \text{ ng mL}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$  (60 min) auf. Mit zunehmender Mischung der beiden Lösungen im Kanal nimmt die Steigung deutlich ab. So ist bereits im zweiten Abschnitt die Steigung um 60 % nach 30 min und 40 % nach 60 min gesunken. Auch zwischen den beiden Flusszeiten der Lösungen im Kanal sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Steigung ist nach 60 min in allen vier Abschnitten deutlich größer. Es dauert

somit einige Zeit, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Lösungen entlang des Kanals eingestellt hat und der genaue Zeitpunkt, ab dem der Gradient stabil ist, muss bestimmt werden. Die Gleichgewichtseinstellung ist bei Zellversuchen zu berücksichtigen, um sicherstellen zu können, dass der vorliegende Gradient im beobachteten Bereich über die Messdauer stabil bleibt.



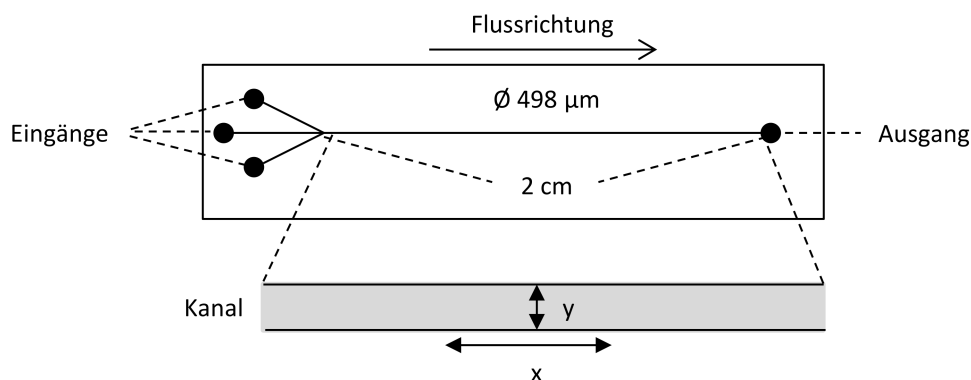
**Abbildung 5.34:** Profile der Fluoreszenzbilder des Gradientenverlaufs von IL-8-S72C-Fluorescein nach 60 min über die Distanz des Kanals. Dabei wurden die Graustufen der Fluoreszenzbilder in die IL-8 Konzentration umgerechnet, indem die maximale Intensität am Eingang des Kanals als eingesetzte IL-8 Konzentration ( $840 \text{ ng mL}^{-1}$ ) angesehen und die am Eingang vorliegende Intensität des PBS als Nullwert verwendet wurde.

**Tabelle 5.5:** Steigung des linearen Bereichs der IL-8-S72C-Fluorescein Gradienten in mikrofluidischen Kanälen nach 30 und 60 min.

Bereich des Gradienten	$\Delta c_{30 \text{ min}} / \text{ng mL}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$	$\Delta c_{60 \text{ min}} / \text{ng mL}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$
1	16,9	18,6
2	6,9	11,1
3	2,7	6,6
4	1,6	4,3

### Optimierung der Gradienten für Chemotaxis

Nachdem prinzipiell Gradienten mit mikrofluidischen Kanälen generiert werden konnten, bestand der nächste Schritt in der Erweiterung der Parameter auf Kanäle, die für Migrationsversuche mit Zellen geeignet sind, da der Durchmesser der Kanäle mit  $100 \mu\text{m}$  eine zu kurze Migrationsdistanz aufwies. Die zur Verfügung stehenden Zellen wiesen eine Größe von 10 bis  $50 \mu\text{m}$  auf und eine maximale Migrationsdistanz von  $100 \mu\text{m}$  ist somit zu gering. Aus diesem Grund wurde der Kanaldurchmesser auf  $498 \mu\text{m}$  ausgeweitet. Außerdem war ein Eingang für die Zellsuspension erforderlich, der ebenfalls in neuen Kanälen realisiert wurde. Der neue Aufbau des Kanals ist in Abbildung 5.35 dargestellt.

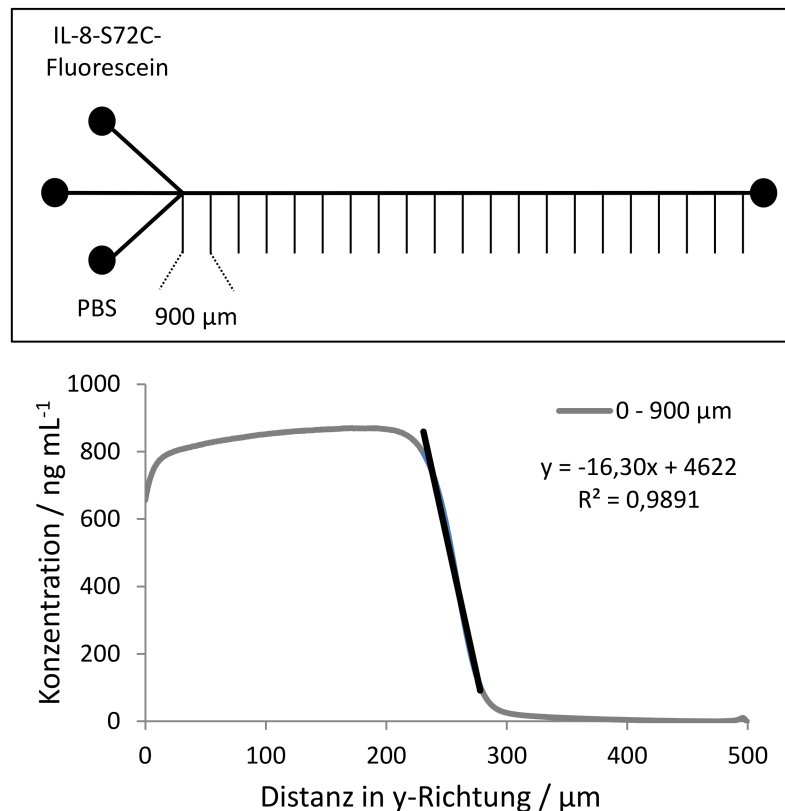


**Abbildung 5.35:** Mikrofluidischer Kanal für Migrationsversuche mit drei Eingängen und einem Ausgang. Der Innendurchmesser des Kanals beträgt  $498\,\mu\text{m}$  mit einer Kanallänge von ca. 2 cm.

Da sich das Layout verändert hatte, war zunächst die Gradientenbildung im Kanal zu überprüfen. Dabei wurde zunächst der mittlere Kanal nicht verwendet, sondern nur die beiden äußeren. Die Flussrate betrug weiterhin  $0,5\,\mu\text{L min}^{-1}$ . Es wurden erneut Fluoreszenzbilder mithilfe des Mikroskops nach ca. 60 min aufgenommen. In diesem Fall wurden die x- und y-Positionen des Kanals so positioniert, dass die Bilder die komplette Länge des Kanals abbildeten. Ein Bild gibt einen Ausschnitt von  $900\,\mu\text{m}$  wieder, sodass alle  $900\,\mu\text{m}$  ein Bild erzeugt und insgesamt 22 Bilder über die Länge des Kanals von ca. 2 cm erhalten wurden (Abbildung 5.36). Von den Fluoreszenzbildern wurden Intensitätsprofile über den Querschnitt des Kanals in y-Richtung erstellt, die wie bereits beschrieben auf die IL-8 Konzentration umgerechnet wurden. Es ist beispielhaft das Profil des ersten Bildabschnitts direkt nach den beiden Eingängen dargestellt (Abbildung 5.36). Der Verlauf des Gradienten ähnelt dem im  $100\,\mu\text{m}$  Kanal und hat ebenfalls eine sigmoidale Form. Auch hier war zu Beginn eine Trennung der beiden Flüssigkeiten zu erkennen, wodurch sich ein sehr steiler Gradient in der Mitte des Kanals ergab. Abbildung 5.37 zeigt den Verlauf der Konzentrationsgradienten in y-Richtung der einzelnen Bildbereiche abhängig von der Kanalposition in x-Richtung.

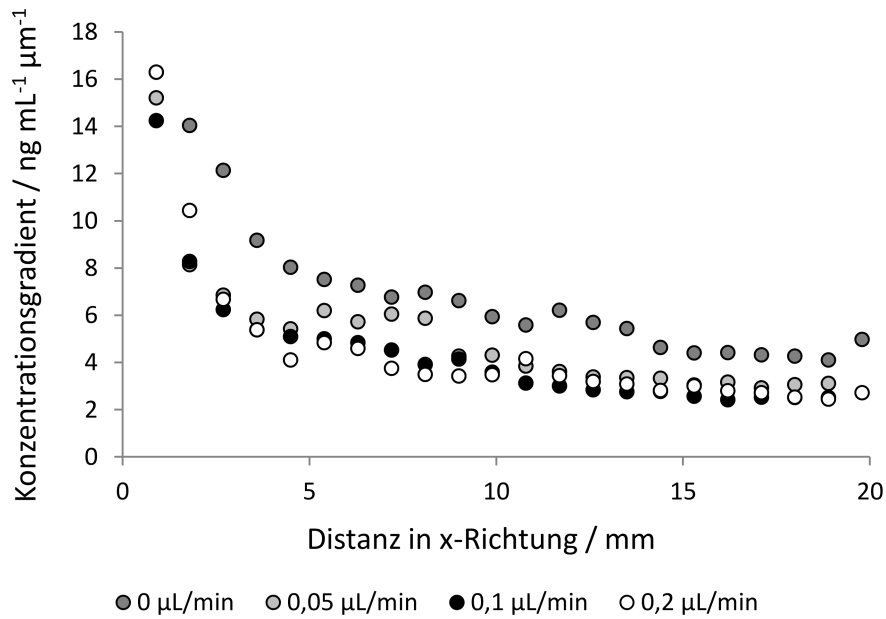
Der Gradient war zu Beginn, also direkt nach Vermischung der beiden Lösungen nach den Eingängen, am steilsten und zeigt dort sein Maximum bei  $16,3\,\text{ng mL}^{-1}\,\mu\text{m}^{-1}$  im ersten Bildabschnitt. Innerhalb der ersten 5 mm sank er relativ schnell auf einen Wert von ca.  $8\,\text{ng mL}^{-1}\,\mu\text{m}^{-1}$ . Über den restlichen Kanal wurde die Steigung weiterhin geringer, wobei die Steigung des Gradienten mit zunehmender Distanz in x-Richtung deutlich langsamer abnahm. Am Ende des Kanals auf den letzten 5 mm konnte kaum eine Änderung beobachtet werden und der Wert lag zwischen  $4,5$  und  $4\,\text{ng mL}^{-1}\,\mu\text{m}^{-1}$ . In diesem Bereich war die Diffusion so langsam, sodass kaum noch Änderungen zu beobachten waren.

Über den mittleren Eingang sollten Zellen in den Mikrokanal eingebracht werden. Es musste daher der Einfluss der Flussrate dieses Eingangs auf den Gradienten bestimmt werden. Dazu wurde für die beiden äußeren Eingänge weiterhin eine Flussrate von  $0,5\,\mu\text{L min}^{-1}$  verwendet, während die des mittleren Kanals variiert wurde. In diesem Eingang wurde PBS verwendet, da im späteren Versuch die Zellen ebenfalls in PBS bzw. Medium hinzugegeben werden sollten. Um den Einfluss möglichst gering zu halten, wurden die kleinste, einstellbare Flussrate von  $0,05\,\mu\text{L min}^{-1}$  und zwei weitere ( $0,1$  und  $0,2\,\mu\text{L min}^{-1}$ ) getestet. Dabei entsprach die Vorgehensweise der oben beschriebenen: zunächst wurden 22 Fluoreszenzbilder über den Kanal aufgenommen, deren Intensitätsprofile über



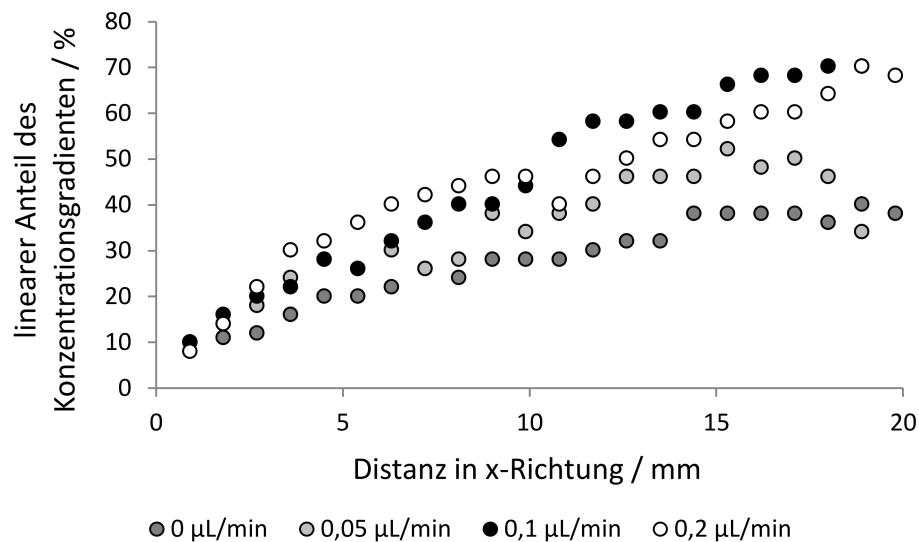
**Abbildung 5.36:** IL-8-S72C-Fluorescein Gradient in mikrofluidischen Kanälen mit drei Eingängen und einem Kanaldurchmesser von 498 µm. Oben: Schematische Darstellung des Kanals mit Markierung der einzelnen Bildbereiche (900 µm), die im Mikroskop aufgenommen wurden. Unten: Beispielprofil des Gradienten direkt nach den Eingängen (erstes Bild zwischen 0 und 900 µm). Die Intensitätsprofile wurden durch Mittlung über die gesamte Breite des Bildes von 900 µm erhalten. Dabei wurden die Graustufen der Fluoreszenzbilder in die IL-8 Konzentration umgerechnet, indem die maximale Intensität am Eingang des Kanals gleich der eingesetzten IL-8 Konzentration (840 ng mL<sup>-1</sup>) gesetzt und die am Eingang vorliegende Intensität des PBS als Nullwert verwendet wurde.

den kompletten Bereich des Bildes erstellt und so die Konzentrationsgradienten berechnet wurden. Die Steigungen der linearen Bereiche der Gradienten in y-Richtung in Abhängigkeit von der Position im Kanal (x-Richtung) sind ebenfalls in Abbildung 5.37 dargestellt. Die Verläufe der Gradienten für die drei Flussraten im mittleren Kanal sahen nahezu gleich aus und es wurden sehr ähnliche Steigungen an den gleichen Positionen erhalten. Die Steigung der Gradienten fiel am Anfang des Kanals deutlich steiler ab und der Abfall wird, wie bereits oben beschrieben, mit zunehmender Position in x-Richtung deutlich geringer. Auch hier konnte am Ende des Kanals auf den letzten 5 mm eine annähernd konstante Steigung zwischen 2,5 und 3 ng mL<sup>-1</sup> µm<sup>-1</sup> beobachtet werden, da die Änderungen durch Diffusion sehr gering waren. Über den gesamten Kanal war jedoch ein deutlicher Unterschied zum Gradienten ohne Verwendung des mittleren Kanals zu beobachten. Absolut gesehen wurde durch Verwendung des mittleren Eingangs der Konzentrationsgradient herabgesetzt. Dieser ist dabei aber relativ unabhängig von der verwendeten Flussrate des mittleren Eingangs. Es ist zu beachten, dass zur Berechnung der Steigung jeweils nur der lineare Bereich des Konzentrationsgradienten in y-Richtung ausgewertet wurde.



**Abbildung 5.37:** Verlauf der Steigung der IL-8-S72C-Fluorescein Gradienten in y-Richtung entlang des Mikrofluidikkannels (x-Richtung) bei Verwendung von drei Eingängen mit einer Flussrate von  $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$  für die beiden äußeren Eingänge für IL-8-S72C-Fluorescein und PBS. Die Messung erfolgte nach ca. 60 min. Die Flussrate des mittleren Kanals mit PBS wurde variiert: 0 (keine Strömung im mittleren Kanal), 0,05, 0,1 und  $0,2 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Für Zellversuche ist jedoch nicht nur die Steigung des Gradienten entscheidend, sondern auch die Länge des linearen Bereichs, der möglichst groß bezogen auf die Gesamtdistanz in y-Richtung sein sollte. Daher wurde der Anteil an linearem Gradienten vom gesamten Konzentrationsgradienten in y-Richtung über  $498 \mu\text{m}$  für alle vier Flussraten im mittleren Kanal abhängig von der Position im Kanal bestimmt (Abbildung 5.38). Der lineare Anteil war zu Beginn des Kanals bei allen vier Flussraten nur 10 % und nahm im Verlauf des Kanals zu. Dabei konnte in den ersten 10 mm des Kanals ein Zusammenhang zur verwendeten Flussrate im mittleren Kanal bestimmt werden, denn je höher die Flussrate, umso schneller war die Zunahme an linearem Anteil. Ab ungefähr der Mitte des Kanals zeigte eine Flussrate von  $0,1 \mu\text{L/min}$  einen höheren Anstieg bis 70 % als die Flussrate von  $0,2 \mu\text{L/min}$ . Es wäre zu erwarten gewesen, dass je größer die Flussrate, umso größer der Einfluss auf die Länge des linearen Bereichs. Durch die Verwendung des mittleren Kanals findet zusätzlich eine Verdünnung in der Mitte des Kanals mit PBS statt, sodass sich der Verlauf des Gradienten ändert. Anhand der niedrigen linearen Anteile vor allem bei keiner Flussrate im mittleren Kanal wird deutlich, dass der Prozess der Diffusion für den gewählten Durchmesser von  $498 \mu\text{m}$  zu langsam ist, um eine größere Vermischung der beiden Flüssigkeiten zu erhalten. Der Fluss des mittleren Kanals sorgt für eine Verlängerung des linearen Bereichs, der maximal 70 % beträgt. Für Zellversuche sollte mindestens ein linearer Anteil von 70 - 80 % entsprechend einer Migrationsstrecke von  $350 - 400 \mu\text{m}$  gegeben sein, der für Flussraten von  $0,1$  und  $0,2 \mu\text{L min}^{-1}$  im mittleren Kanal knapp erreicht werden konnte.



**Abbildung 5.38:** Anteil des linearen Bereichs der Konzentrationsgradienten an IL-8-S72C-Fluorescein in y-Richtung abhängig von der Position im Kanal (x-Richtung) bei Verwendung von drei Eingängen mit einer Flussrate von  $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$  für die beiden äußeren Eingänge für IL-8-S72C-Fluorescein und PBS. Die Flussrate des mittleren Kanals mit PBS wurde variiert: 0 (keine Strömung im mittleren Kanal), 0,05, 0,1 und  $0,2 \mu\text{L min}^{-1}$ .

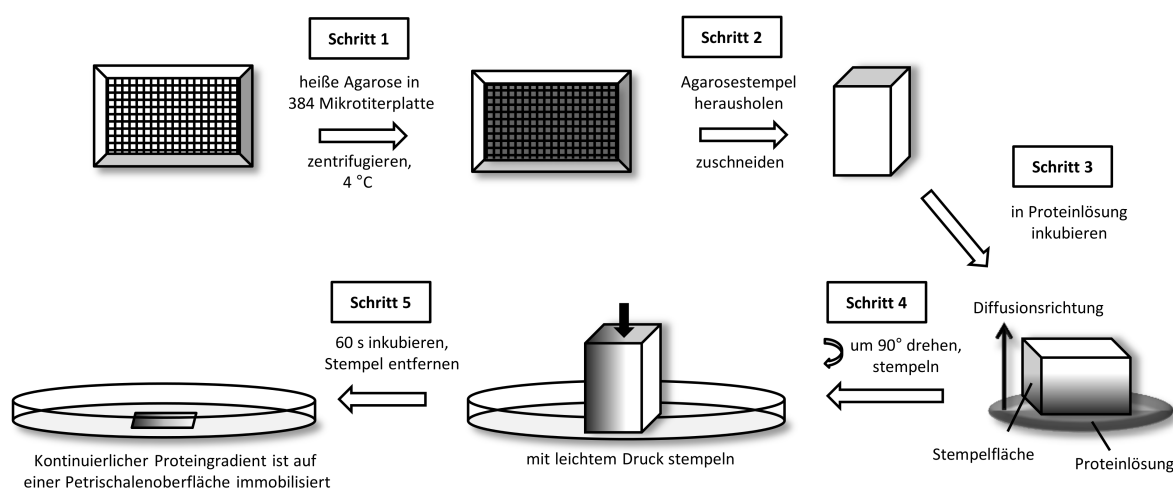
### 5.3.2 Haptotaxisassay für Leukozyten basierend auf oberflächengebundenen Chemokingradienten

Mayer *et al.* haben die Diffusion von BSA in Hydrogelen zur Erzeugung von Proteingradienten beschrieben.<sup>[202]</sup> Mit dieser Methode konnten kontinuierliche Gradienten von Proteinen erhalten werden, die durch einen einfachen Stempelprozess auf eine aldehydfunktionalisierte Oberfläche übertragen und dort kovalent immobilisiert wurden. Basierend auf dieser Arbeit sollten IL-8 Gradienten hergestellt, immobilisiert und in Zellversuchen getestet werden. Ein Teil der praktischen Arbeit wurde im Rahmen der Bachelor-Thesis von Daniel Sachs durchgeführt. Diese Arbeit wurde original veröffentlicht in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*<sup>[217]</sup>

#### Optimierung der diffusionskontrollierten Proteingradienten in Agarosegelen

Um die Methode von Mayer *et al.* zu testen, war eine reproduzierbare Formgebung für die Agarosegele notwendig. Es sollte eine möglichst kubische oder quaderförmige Form sein, die eine geeignete Stempelfläche für den Transfer der Gradienten darstellt. Diese sollte möglichst klein sein, damit ein für die Größe der Zellen passender Konzentrationsgradient erhalten wurde. Dazu wurde eine 384-Well-Mikrotiterplatte (Greiner) als Gießform verwendet, bei der jede Kavität einen Stempel lieferte. Die Agarosestempel wurden durch Gießen einer heißen Agaroselösung in die Kavitäten der Mikrotiterplatten hergestellt. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert, damit sämtliche viskose Agaroselösung in die Kavität hineinfließt (Abbildung 5.39, Schritt 1). Nach Aushärten der Agarose bei  $4^\circ\text{C}$

wurden die Stempel vorsichtig mit einer Pinzette aus den Kavitäten herausgeholt und auf eine Länge von ca. 5 mm zugeschnitten (Schritt 2). Aus der Grundfläche der Kavitäten resultierte eine Stempelfläche von  $3,6 \cdot 3,6 \text{ mm}^2$ . Die Gradientenbildung erfolgte, indem der Stempel der Länge nach in Chemokinlösung gelegt wurde. Dabei saugte sich die Agarose voll mit der Chemokinlösung, wodurch ein Konzentrationsgradient entstand (Schritt 3). Nach Waschen des Stempels wurde er direkt auf eine Petrischalenoberfläche gestempelt. Dabei wurde die quadratische Fläche des Stempels vorsichtig und möglichst flach auf die Oberfläche gesetzt, wobei ein sanfter Druck ausgeübt wurde (Schritt 4). Nach 60 s Inkubation auf der Oberfläche war der Transfer des Proteins abgeschlossen und es konnte derselbe Stempel zum Transfer des gleichen Profils für weitere Oberflächen verwendet werden (Schritt 5).

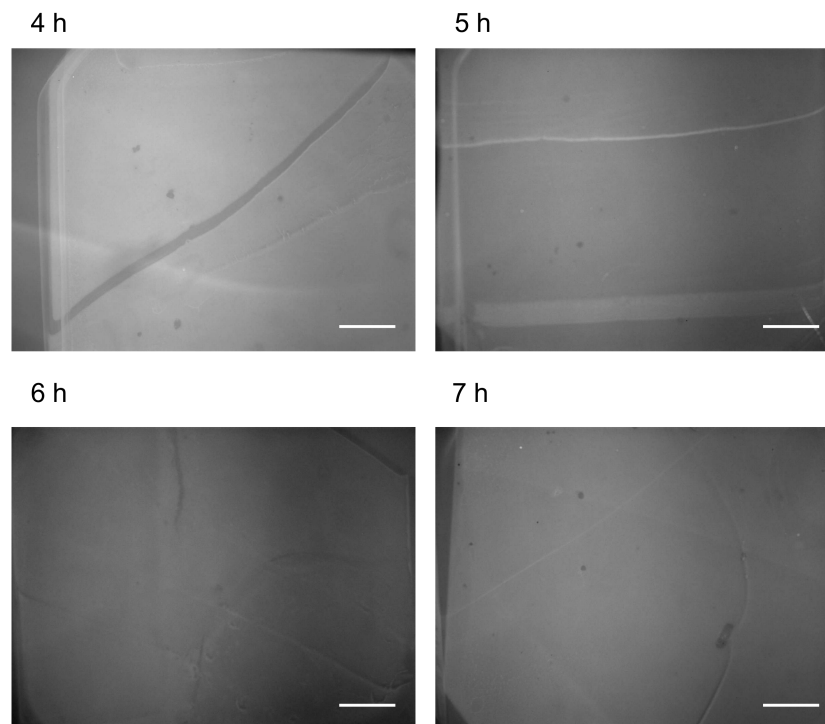


**Abbildung 5.39:** Schematische Darstellung der Stempelherstellung und des Stempelprozesses. Schritt 1: Heiße 3 %ige Agaroselösung wird in eine 384-Well-Mikrotiterplatte gegossen, zentrifugiert und zur Aushärtung der Agarose bei 4 °C gekühlt. Schritt 2: Der Stempel wird vorsichtig mit einer Pinzette aus der Kavität herausgeholt und zugeschnitten. Schritt 3: Der Stempel wird der Länge nach in Proteinlösung gelegt und nach Inkubation gewaschen. Schritt 4: Der Stempel wird um 90° gedreht und mit der Stempelfläche in Kontakt mit der Oberfläche einer Petrischale gebracht, indem ein leichter Druck ausgeübt wird. Schritt 5: Der Stempel wird für 60 s auf der Oberfläche inkubiert, bevor er entfernt wird. Es entsteht ein immobilisierter Proteingradient der Größe  $3,6 \cdot 3,6 \text{ mm}^2$  auf einer Petrischalenoberfläche. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

Zunächst wurde die Methode mit den gleichen Parametern und dem gleichen Protein (wie von Mayer *et al.* beschrieben) durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse reproduzierbar waren. Dazu wurde FITC-markiertes BSA verwendet, das unspezifisch mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert und über eine Gelfiltrationssäule von überschüssigem FITC getrennt worden war. Es wurden wie in der Literatur beschrieben ein 3 %iges Agarosegel und Diffusionszeiten von 4 - 7 h verwendet. Der einzige Unterschied bestand in der verwendeten Oberfläche. Es wurde eine Petrischalenoberfläche verwendet, die mit Hydroxy- und Carboxygruppen funktionalisiert war und nicht mit Aldehydgruppen. Dies schloss eine kovalente Immobilisierung des Proteins aus, was jedoch



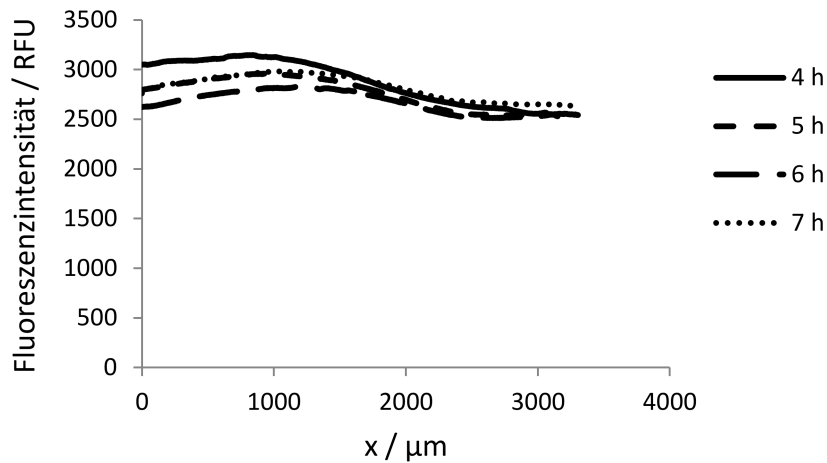
nicht notwendig war, sofern das Protein nicht-kovalent an der Oberfläche haften blieb. Abbildung 5.40 zeigt die Aufnahmen der immobilisierten FITC-BSA Gradienten im Fluoreszenzmikroskop.



**Abbildung 5.40:** FITC-BSA Gradienten nach verschiedenen Diffusionszeiten (4, 5, 6 und 7 h). Belichtungszeit: 1200 ms. Filter: 38HE (Carl Zeiss). Vergrößerung: 5x. Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ .

Es wurden relativ homogen beschichtete Oberflächen erhalten, die jedoch teilweise Schlieren und andere Artefakte aufwiesen. Mit dem bloßen Auge betrachtet schien das erste Bild bei einer Diffusionszeit von 4 h die größte Fluoreszenzintensität aufzuweisen. Es war ein Konzentrationsgefälle von links nach rechts bei allen vier Gradienten erkennbar, jedoch konnten auf den ersten Blick zwischen den verschiedenen Diffusionszeiten keine Unterschiede erkannt werden. Um den Unterschied in der Fluoreszenzintensität und der Steigung der Konzentrationsgradienten zu quantifizieren, wurden Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder gemittelt über die gesamte Breite erstellt (Abbildung 5.41). Diese Profile bestätigten den ersten Eindruck. Nach vierstündiger Diffusionszeit war die Fluoreszenzintensität am größten und es wurde der steilste Verlauf des Gradienten erhalten. Dieser erstreckte sich jedoch nicht wie erwartet über die komplette Stempelfläche, sondern wies bei höherer und niedrigerer Konzentration ein Plateau auf. Der Verlauf der Gradienten von den drei weiteren Diffusionszeiten sah ähnlich aus und es konnten keine größeren Unterschiede in der Fluoreszenzintensität ausgemacht werden. Zur besseren Vergleichbarkeit des Verlaufs der Gradienten wurden die Steigungen des linearen Bereichs berechnet (Tabelle 5.6).

Die Steigung war nach vierstündiger Diffusionszeit oder schon früher maximal mit einer Änderung von  $2,43 \text{ RFU } \mu\text{m}^{-1}$  und flachte nach längerer Diffusion deutlich ab. Die linearen Bereiche für die Diffusionszeiten von 5, 6 und 7 h wiesen nur noch Steigungen zwischen  $0,3$  und  $0,4 \text{ RFU } \mu\text{m}^{-1}$  auf und zeigten kaum Unterschiede zueinander. Auch änderte sich die Länge des linearen Bereichs der



**Abbildung 5.41:** Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder der FITC-BSA Gradienten nach verschiedenen Diffusionszeiten (4, 5, 6 und 7 h) aus Abbildung 5.40.

**Tabelle 5.6:** Parameter der BSA Gradienten erzeugt durch die Methode von Mayer *et al.*. Es wurden vier verschiedene Diffusionszeiten getestet. Die Steigungen und die linearen Bereiche der Gradienten wurden bestimmt.

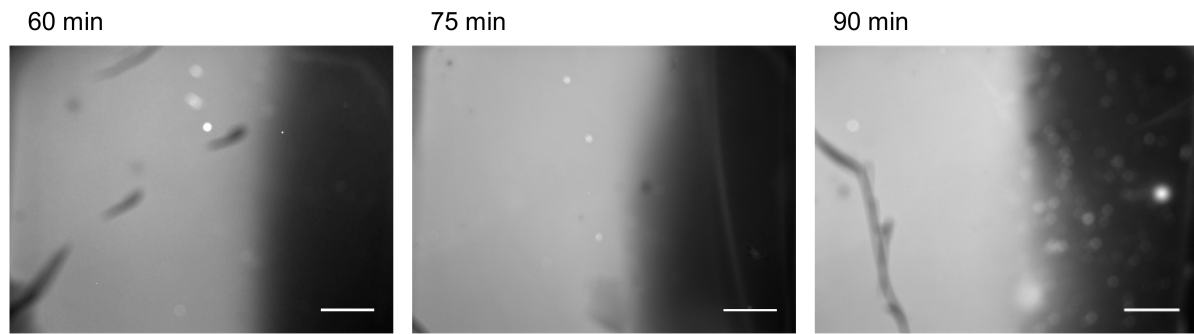
Diffusionszeit	4 h	5 h	6 h	7 h
Steigung der BSA Beladung / $\text{RFU } \mu\text{m}^{-1}$	2,43	0,37	0,32	0,33
Position des linearen Bereichs des Gradienten / $\mu\text{m}$	1200 - 2200	1500 - 2300	1500 - 2300	1800 - 2200
Länge des linearen Bereichs / $\mu\text{m}$	1000	800	800	400

Gradienten durch die verlängerte Diffusionszeit. Nach 4 h konnte der längste Bereich mit  $1000 \mu\text{m}$  beobachtet werden, der durch längere Diffusion über 800 bis zu  $400 \mu\text{m}$  abnahm.

Die Methode von Mayer *et al.* konnte demnach reproduziert werden und lieferte immobilisierte Konzentrationsgradienten von FITC-BSA. Auch die andere Oberfläche zur Immobilisierung stellte offenbar kein Problem dar und das Protein konnte zweifelsfrei auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Somit war die Grundlage für die Herstellung von IL-8 Gradienten geschaffen.

Aufgrund der deutlich geringeren Größe von IL-8 mit 8,4 kDa im Vergleich zu BSA mit 66 kDa wurden die Diffusionszeiten verkürzt und folgende Zeiten getestet: 60, 75 und 90 min. Nach Antikörperfärbung wurden die Oberflächen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 5.42). Das Stempeln der IL-8 Gradienten konnte analog zum BSA erfolgreich durchgeführt werden. Bei 60- und 90-minütiger Diffusion waren einige Artefakte zu erkennen, die vermutlich beim Waschen der Oberfläche, z.B. durch Berührung mit der Pipettenspitze, entstanden waren. Alle drei Diffusionszeiten zeigten einen deutlichen Konzentrationsgradienten anhand der veränderten Fluoreszenzintensität.

Die Übertragung der Methode von BSA auf IL-8 war somit erfolgreich und es konnten immobilisierte IL-8 Gradienten generiert werden.

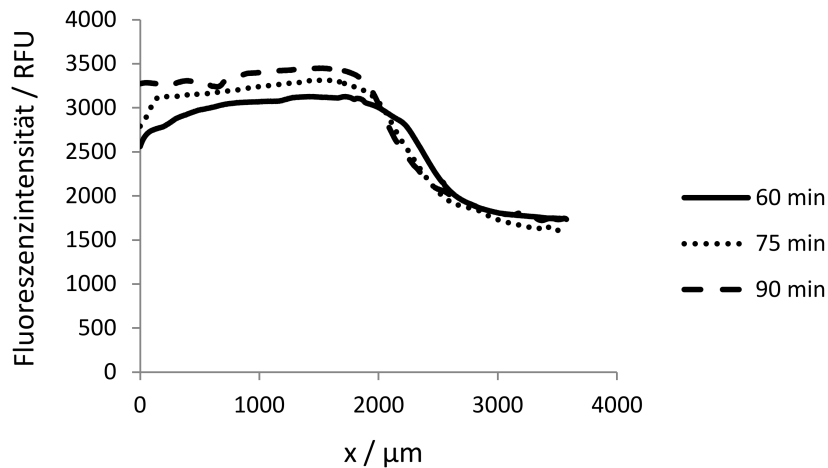


**Abbildung 5.42:** IL-8 Gradienten nach verschiedenen Diffusionszeiten (60, 75 und 90 min). Zur Visualisierung des Proteins wurde eine Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper durchgeführt. Belichtungszeit: 3000 ms. Filter: 38HE (Carl Zeiss). Vergrößerung: 5x. Maßstab: 500  $\mu$ m. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

Die verwendete Polystyroloberfläche der Petrischale ist mit Hydroxy- und Carboxygruppen funktionalisiert, sodass die Vermutung naheliegt, dass die Immobilisierung des positiv geladenen IL-8 auf der negativ geladenen Oberfläche auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Ein eingetrockneter Tropfen einer IL-8 Lösung war jedoch nach Immunfärbung nicht detektierbar. Im Gegensatz dazu führte das Stempeln mit einem reinen Agarosestempel auf der Oberfläche und anschließendes Trocknen eines IL-8 Tropfens auf dieser Agaroseschicht zu einer detektierbaren Proteinoberfläche. Somit wurde gezeigt, dass IL-8 nicht an die Petrischalenoberfläche bindet, sondern die Immobilisierung über die Agarose erfolgte, die beim Stempelprozess auf der Oberfläche haftet. Das Chemokin bindet offenbar an die abgeschiedene Agaroseschicht auf der Oberfläche. Dafür spricht auch, dass BSA auf der Oberfläche immobilisiert werden konnte, obwohl BSA einen  $pI < 7$  hat und somit im Gegensatz zu IL-8 eine negative Nettoladung bei neutralem pH aufweist. Beide Proteine haben unterschiedliche Ladungen und konnten beide durch dieses Verfahren immobilisiert werden, sodass die Bindung an die Oberfläche offenbar durch die Agaroseschicht und nicht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen vermittelt wird.

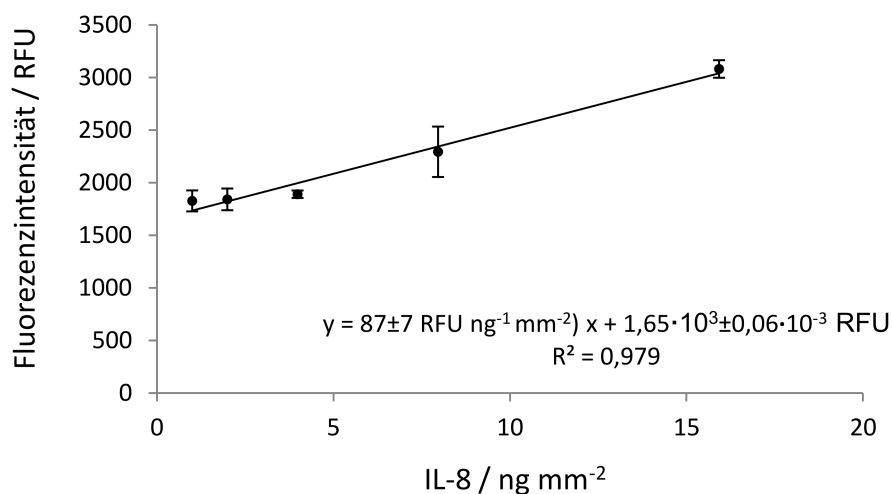
Zur Evaluation der erhaltenen Gradienten wurden Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder gemittelt über die gesamte Breite erstellt, um so den Einfluss der Diffusionszeit auf die Verläufe der Gradienten zu ermitteln (Abbildung 5.43). Für alle drei Gradienten konnte ein sigmoidaler Verlauf beobachtet werden. Zwischen den beiden Plateaus konnte ein näherungsweise linearer Verlauf der Konzentration gezeigt werden. Überraschenderweise zeigten die verschiedenen Diffusionszeiten keinen großen Einfluss auf die Form und die Steilheit des Gradienten. Die Verläufe waren nahezu alle gleich. Nur die Höhe des oberen Plateaus wies mit zunehmender Inkubationszeit höhere Werte auf.

Zur Quantifizierung der immobilisierten Menge an IL-8 wurde eine Kalibriergerade erstellt. Es wurden drei unabhängige Versuche dafür durchgeführt, um Unregelmäßigkeiten des experimentellen Setups, z.B. Intensitätsschwankungen der Fluoreszenzlampe, einschätzen zu können, die sich in der Standardabweichung widerspiegeln. Dazu wurde eine definierte Menge IL-8 auf einer mit Aga-



**Abbildung 5.43:** Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder der IL-8 Gradienten nach verschiedenen Diffusionszeiten (60, 75 und 90 min) aus Abbildung 5.42. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

rose beschichteten Petrischalenoberfläche trocknen gelassen und mittels FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Durch Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die aufgetragene Menge IL-8 pro Fläche wurde eine Kalibriergerade erhalten (Abbildung 5.44).



**Abbildung 5.44:** Kalibriergerade zur Bestimmung der immobilisierten IL-8 Menge auf der Oberfläche aus der Fluoreszenzintensität nach Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop bei 3000 ms Belichtungszeit. Lösungen bekannter IL-8 Konzentrationen wurden auf einer gestempelten Schicht Agarose auf einer Petrischalenoberfläche eintrocknen gelassen und mit dem FITC-Antikörper nachgewiesen. Aus der Tropfenfläche mit bekannter immobilisierter IL-8 Menge wurde von der Fluoreszenzintensität auf die Masse an IL-8 pro Fläche umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 3$ ).

Die Kontrolle mit anti-IL-8 Antikörper auf reiner Agarose zeigte keine Fluoreszenz bei den gewählten Bedingungen. Im Bereich von 1 bis 15 ng mm<sup>-2</sup> wurde ein linearer Bereich identifiziert, der

mit einem Korrelationskoeffizient  $R^2$  von 0,98 den Zusammenhang zwischen immobilisierter Proteinmenge pro Fläche und der Fluoreszenzintensität sehr gut wiedergab. Obwohl nur drei unabhängige Experimente durchgeführt worden waren, waren die Standardabweichungen gering, sodass die Oberflächenbeladung aus der Fluoreszenzintensität offenbar zuverlässig bestimmt werden konnte und das experimentelle Setup keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse nahm. Mithilfe dieser Kalibriergerade wurden für die Gradienten die immobilisierte IL-8 Menge und die Steigungen in  $\text{ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}$  berechnet (Tabelle 5.7).

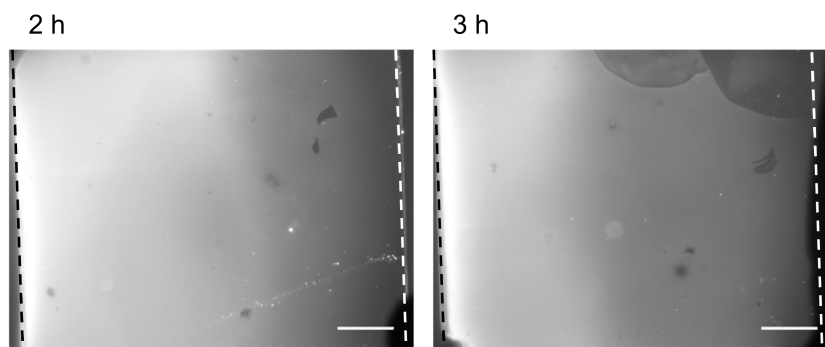
**Tabelle 5.7:** Parameter der IL-8 Gradienten erzeugt durch die Methode von Mayer *et al.*. Es wurden drei verschiedene Diffusionszeiten getestet. Die absoluten IL-8 Mengen im unteren und oberen Bereich sowie die Steigungen, Positionen und Längen der linearen Bereiche der Gradienten wurden bestimmt.

Diffusionszeit	60 min	75 min	90 min
<b>Oberflächenbeladung IL-8 / <math>\text{ng mm}^{-2}</math></b>	$13,5 \pm 1,1 - 4,6 \pm 0,4$	$15,9 \pm 1,3 - 4,6 \pm 0,4$	$16,2 \pm 1,4 - 4,9 \pm 0,4$
<b>Steigung der IL-8 Beladung / <math>\text{ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}</math></b>	$22 \pm 2$	$23 \pm 2$	$22 \pm 2$
<b>Position des linearen Bereichs des Gradienten / <math>\mu\text{m}</math></b>	2200 - 2600	2000 - 2500	2000 - 2500
<b>Länge des Gradienten / <math>\mu\text{m}</math></b>	400	500	500

Wie anhand der Profile zu erwarten war, zeigten sich keine großen Unterschiede in der immobilisierten IL-8 Menge für die drei Diffusionszeiten. Der niedrige Konzentrationsbereich der Gradienten bewegte sich zwischen  $4,6 \pm 0,4$  und  $4,9 \pm 0,4 \text{ ng mm}^{-2}$ , wobei diese Werte im Rahmen des Fehlers gleich waren. Der obere Konzentrationsbereich zeigte Werte zwischen  $13,5 \pm 1,1$  (60 min) und  $16,2 \pm 1,4 \text{ ng mm}^{-2}$  (90 min) und unterschied die niedrigste Diffusionszeit von den anderen beiden. Die Steigungen bestätigten dieses Ergebnis. Die Werte lagen in einem Bereich von  $22 \pm 2$  bis  $23 \pm 2 \text{ ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}$  und unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Für 75 und 90 min Diffusionszeit erstreckte sich der lineare Bereich über  $500 \mu\text{m}$ , während der bei 60-minütiger Diffusion nur  $400 \mu\text{m}$  betrug. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Diffusionszeit von 75 min für die Generierung von Gradienten für Zellexperimente verwendet.

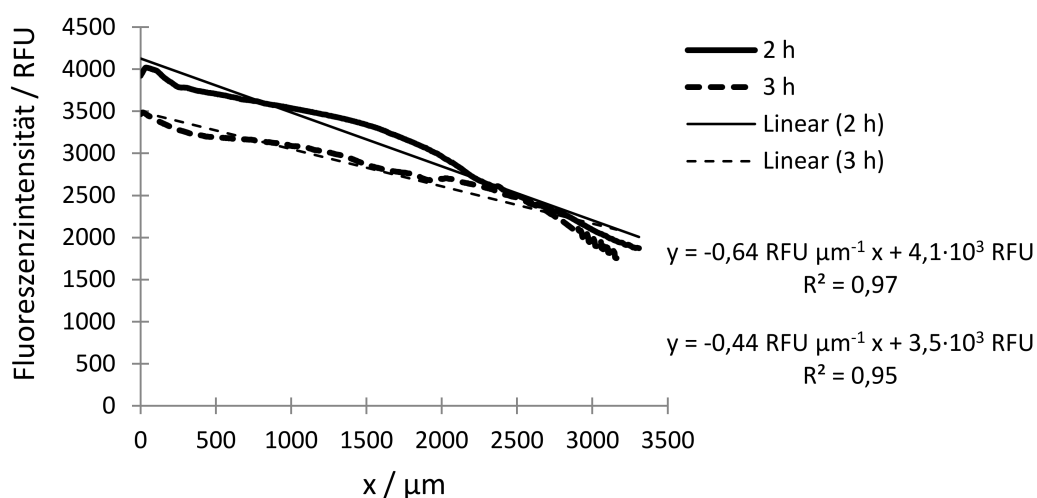
Mit der oben beschriebenen Methode ließen sich lineare Gradienten nur über eine Strecke von  $500 \mu\text{m}$  und nicht die gesamte Breite der Stempelfläche erzeugen. In Zellversuchen auf den Oberflächen würde dies die Durchführung vereinfachen, da sich der lineare Gradient an jeder Stelle der Stempelfläche befindet. Um diesen linearen Bereich auszuweiten, wurde ein modifiziertes Protokoll zur Generierung des Gradienten verwendet. Der Stempel wurde wie oben beschrieben hergestellt und in Chemokinlösung für 60 min inkubiert. In dieser Zeit wurde die IL-8 Lösung vollständig vom Agarosestempel aufgenommen. Anschließend wurde Wasser am Boden des Stempels hinzugegeben, um die Diffusion des Proteins in der Agarose weiter voranzutreiben. Die Inkubationszeiten wurden

auf 2 und 3 h verlängert. Nach Immunfärbung wurden die Oberflächen im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 5.45).



**Abbildung 5.45:** Fluoreszenzbilder der IL-8 Gradienten hergestellt nach der modifizierten Methode. Zwei verschiedene Diffusionszeiten (2 und 3 h) wurden getestet. Zur Visualisierung des Proteins wurde eine Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper durchgeführt. Belichtungszeit: 3000 ms. Filter: 38HE (Carl Zeiss). Vergrößerung: 5x. Maßstab: 500 µm. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

Die Gradienten schienen sich über die ganze Stempelfläche zu erstrecken. Um dies nachzuweisen, wurden erneut Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder erstellt (Abbildung 5.46).



**Abbildung 5.46:** Profile der Fluoreszenzbilder der IL-8 Gradienten nach der modifizierten Methode (2 und 3 h Diffusionszeit) aus Abbildung 5.45. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

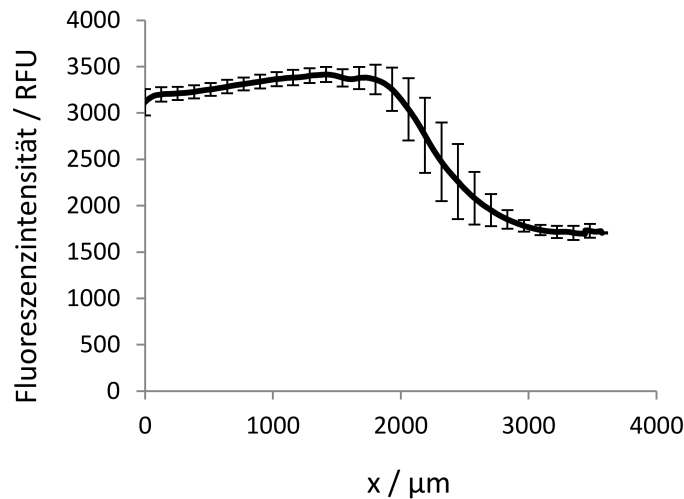
Beide Gradienten zeigten einen nahezu linearen Verlauf über die komplette Stempelfläche. Der Gradient nach 3 h wies einen niedrigeren Maximalwert und somit eine geringe Steigung als der Gradient nach 2 h Diffusionszeit auf. Weiterhin wurden für diese beiden Gradienten die immobilisierte IL-8 Menge und die Steigung berechnet (Tabelle 5.8). Der Maximalwert beider Gradienten lag im Sätti-

gungsbereich der Fluoreszenzintensität und damit über  $20 \text{ ng mm}^{-2}$ . Die Daten wurden unter der Annahme, dass der Verlauf über die komplette Stempelfläche linear ist, ausgewertet. Die Minimalwerte unterschieden sich mit  $2,9 \pm 0,3$  und  $5,1 \pm 0,4 \text{ ng mm}^{-2}$  deutlicher im Vergleich zu den über die erste Methode hergestellten Gradienten. Auch die Steigungen waren mit  $0,008 \pm 7 \cdot 10^{-4} \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  für 2 h und  $0,005 \pm 4 \cdot 10^{-4} \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  für 3 h sehr niedrig, jedoch verliefen sie nahezu über die komplette Stempelfläche von  $3600 \mu\text{m}$  linear. Aufgrund der etwas höheren Steigung wurde die zweistündige Diffusionszeit für Zelleexperimente gewählt.

**Tabelle 5.8:** Parameter der IL-8 Gradienten erzeugt durch die modifizierte Methode. Es wurden zwei verschiedene Diffusionszeiten getestet. Die absolute IL-8 Menge im unteren und oberen Bereich sowie die Steigungen, Positionen und Längen der linearen Bereiche der Gradienten wurden bestimmt.

Diffusionszeit	2 h	3 h
<b>Oberflächenbeladung</b> IL-8 / $\text{ng mm}^{-2}$	>20 - $2,9 \pm 0,3$	>20 - $5,1 \pm 0,4$
<b>Steigung der IL-8 Beladung</b> / $\text{ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$	$0,008 \pm 6,7 \cdot 10^{-4}$	$0,005 \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$
<b>Position des linearen Bereichs des Gradienten</b> / $\mu\text{m}$	0 - 3500	0 - 3500
<b>Länge des Gradienten</b> / $\mu\text{m}$	3500	3500

Im nächsten Schritt war die Reproduzierbarkeit des Stempelprozesses und der Gradientenerzeugung der ersten Methode zu testen. Dazu wurden von fünf nacheinander gestempelten Oberflächen Intensitätsprofile erstellt, aus denen ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet wurde (Abbildung 5.47). Da für die hier geplanten Versuche fünf Gradienten ausreichend waren, wurde auf die Auswertung von mehr gestempelten Flächen verzichtet. Der Graph zeigt den typischen sigmoidalen Verlauf mit relativ kleinen Standardabweichungen, die im linearen Bereich des Gradienten am größten sind. Um dies genauer zu analysieren, wurden in Tabelle 5.9 die Steigungen der einzelnen Gradienten der fünf Oberflächen sowie die Position des linearen Bereichs und die Länge des linearen Bereichs aufgeführt.



**Abbildung 5.47:** Reproduzierbarkeit des Stempelprozesses für mehrere Oberflächen gestempelt mit einem Stempel. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von fünf gestempelten Gradienten mit einem Stempel nach 75 min Diffusionszeit. IL-8 wurde durch Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper detektiert und die Intensitätsprofile der Fluoreszenzbilder wurden erstellt und gemittelt. Belichtungszeit: 3000 ms. Vergrößerung: 5x. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

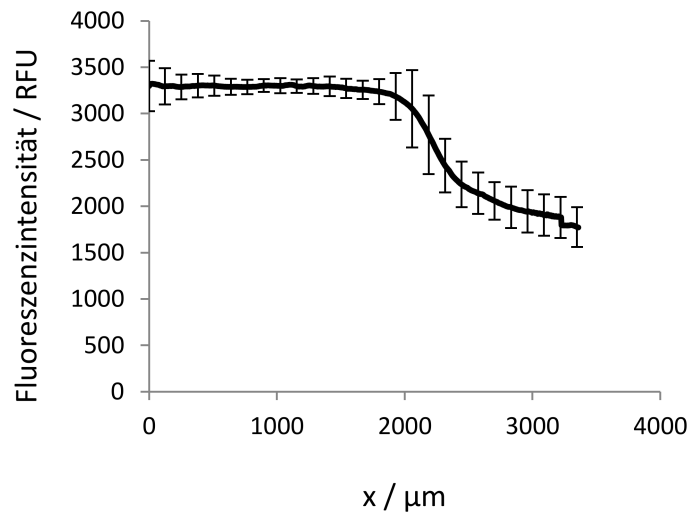
**Tabelle 5.9:** Parameter von fünf gestempelten IL-8 Oberflächen mit demselben Stempel. Die Steigungen im linearen Bereich sowie Positionen und Längen der linearen Bereiche wurden bestimmt.

Oberfläche	1	2	3	4	5
Steigung der IL-8 Beladung / $\text{ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}$	$20 \pm 1,7$	$27 \pm 2,3$	$27 \pm 2,3$	$23 \pm 2,0$	$22 \pm 1,9$
Position des linearen Bereichs des Gradienten / $\mu\text{m}$	1700 - 2200	2000 - 2500	2000 - 2500	2200 - 2700	2000 - 2500
Länge des Gradienten / $\mu\text{m}$	500	500	500	500	500

Die Steigungen schwanken zwischen  $20 \pm 1,7$  und  $27 \pm 2,3 \text{ ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}$  und zeigen, dass Abweichungen im Bereich des Gradienten vorhanden sind. Diese bewegen sich jedoch in einer Größenordnung, die für die verwendeten Zwecke akzeptabel ist. Die linearen Bereiche sind für alle fünf Oberflächen auf einer Länge von  $500 \mu\text{m}$  zu beobachten, dabei ist aber die Position teilweise verschoben. Da die Dimensionen der gestempelten Oberflächen im Mikrometerskala liegen und der ausgewertete Bereich per Hand festgelegt wurde, sind gewisse Abweichungen zu erwarten. Die Daten zeigten aber eindeutig, dass es möglich war, mehrere proteinbeschichtete Oberflächen mit einem Stempel mit einer brauchbaren Reproduzierbarkeit zu generieren.



Um diese Methode langfristig für Zellassays verwenden zu können, ist es essentiell, dass der Gradient sich nicht von Versuch zu Versuch unterscheidet, auch wenn dabei verschiedene Stempel verwendet werden. Weiterhin wurde daher die Reproduzierbarkeit der Stempelherstellung und der Bildung der Gradienten durch Diffusion getestet, indem die Profile dreier mit drei verschiedenen Stempeln gestempelten Oberflächen (an verschiedenen Tagen hergestellt) miteinander verglichen wurden. Es wurden erneut Mittelwerte und Standardabweichungen der Intensitätsprofile aus drei unabhängigen Versuchen gebildet (Abbildung 5.48).



**Abbildung 5.48:** Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses des Stempels und des Gradienten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei IL-8 Gradienten hergestellt mit drei Stempeln unter gleichen Bedingungen nach 75 min Diffusionszeit. IL-8 wurde durch Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper detektiert und die Profile der Fluoreszenzbilder wurden erstellt. Belichtungszeit: 3000 ms. Vergrößerung: 5x. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

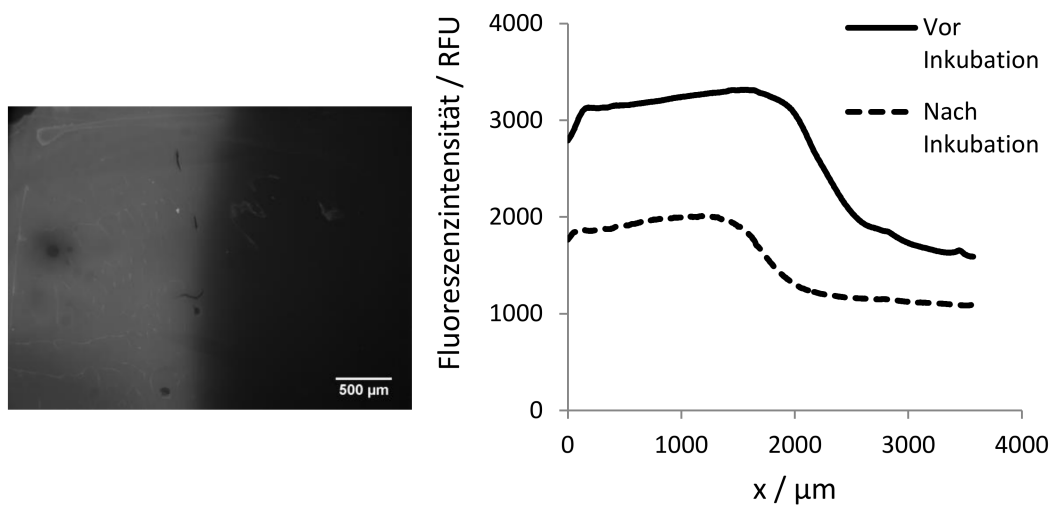
Die Profile zeigten weiterhin denselben sigmoidalen Verlauf in allen drei Experimenten. Die Standardabweichungen waren etwas größer als bei mehrfachem Stempeln mit demselben Stempel und auch hier wurde eine Wertetabelle für die Steigungen und die linearen Bereiche erstellt (Tabelle 5.10).

**Tabelle 5.10:** Parameter von drei mit drei verschiedenen Stempeln gestempelten Oberflächen. Die Steigungen im linearen Bereich sowie Positionen und Längen der linearen Bereiche wurden bestimmt.

Oberfläche	1	2	3
Steigung der IL-8 Beladung / $\text{ng mm}^{-2} \text{mm}^{-1}$	$23 \pm 2$	$26 \pm 2$	$19 \pm 2$
Position des linearen Bereichs des Gradienten / $\mu\text{m}$	1800 - 2300	2000 - 2500	2000 - 2500
Länge des Gradienten / $\mu\text{m}$	500	500	500

Der Bereich, in dem die Steigungen der IL-8 Gradienten lagen, war vergleichbar mit den Daten aus Tabelle 5.9. Somit kann auch der komplette Stempelherstellungsprozess und die Bildung des Gradienten durch Diffusion als ausreichend reproduzierbar eingestuft werden. Das System erwies sich demnach als robust genug, um daraus einen Zellassay zu entwickeln.

Das Protein ist nicht-kovalent in der abgeschiedenen Agarose auf der Oberfläche immobilisiert. *In vivo* ist das Chemokin über Glykosaminoglykane auf der Endothelzellschicht immobilisiert, dessen Bindung ebenfalls nicht-kovalent ist. Da bei Zellexperimenten die Oberfläche über mehrere Stunden Zellkulturmedium ausgesetzt sein würde, war die Stabilität des Gradienten unter diesen Bedingungen zu testen. Dazu wurden die Intensitätsprofile zweier gestempelter Oberflächen, eine vor und eine nach dreistündiger Inkubation in Zellkulturmedium, miteinander verglichen (Abbildung 5.49).



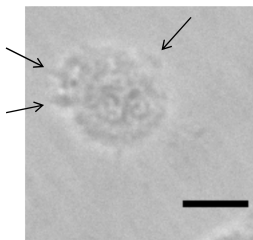
**Abbildung 5.49:** Stabilität des IL-8 Gradienten über eine dreistündige Inkubation in Zellkulturmedium. Links: Fluoreszenzbild des Gradienten nach der dreistündigen Inkubation in Zellkulturmedium und Immunfärbung mit FITC-markiertem anti-IL-8 Antikörper. Rechts: Profile der IL-8 Gradienten vor und nach 3 h Inkubation in Zellkulturmedium. Belichtungszeit: 3000 ms. Filter: 38HE (Carl Zeiss). Vergrößerung: 5x. Maßstab: 500 µm. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität und somit der Proteinmenge auf der Oberfläche ist eindeutig zu erkennen, der sigmoidale Verlauf blieb jedoch nahezu erhalten. Auch die Position des linearen Bereichs blieb weitestgehend erhalten, wobei dieser nach der dreistündigen Inkubation etwas früher bei 1800 µm statt 2000 µm begann. Dabei betrug die Länge des linearen Bereichs weiterhin 500 µm. Die Steigung des Gradienten sank von  $23 \pm 2$  auf  $13 \pm 1$  ng mm<sup>-2</sup> mm<sup>-1</sup> und entsprach somit nur noch ca. der Hälfte an IL-8. Dieser Verlust der Proteinmenge könnte einen kritischen Faktor bei Zellversuchen darstellen. Um den Einfluss dieses Verlusts auf das Zellverhalten zu minimieren, wurde der Bereich zwischen 1500 und 2500 µm für Zellexperimente verwendet. In dieser Region war der lineare Gradient sowohl vor als auch nach der Inkubation in Zellkulturmedium vorhanden, der den wichtigsten Faktor für die Untersuchung von Chemotaxis darstellt, auch wenn die absolute Konzen-

tration abnimmt. Das diffundierte IL-8 könnte zusätzlich einen löslichen Gradienten direkt oberhalb der Oberfläche bilden und so die Haptotaxis positiv beeinflussen.

### Zellverhalten auf IL-8 Gradienten

Nachdem zwei Verfahren zur Herstellung von IL-8 Gradienten mit verschiedenen Verläufen und Steigungen auf Oberflächen aufgezeigt worden waren, wurde als nächstes das Zellverhalten auf diesen Oberflächen untersucht. Dazu wurden frisch isolierte, humane neutrophile Granulozyten verwendet. Bevor diese auf den Proteinoberflächen getestet wurden, wurde das Zellverhalten auf der Petrischalenoberfläche und auf einer reinen Agaroseschicht untersucht. Über eine Zeitspanne von 60 min wurde jede Minute ein Bild am Mikroskop aufgenommen, um das Zellverhalten zeitaufgelöst beobachten zu können. Es war kein Unterschied im Zellverhalten zwischen beiden Oberflächen sichtbar. Die Zellen adhärten auf den Oberflächen und wurden dabei flacher und größer, zeigten jedoch keine Polarisierung, (Abbildung 5.50).

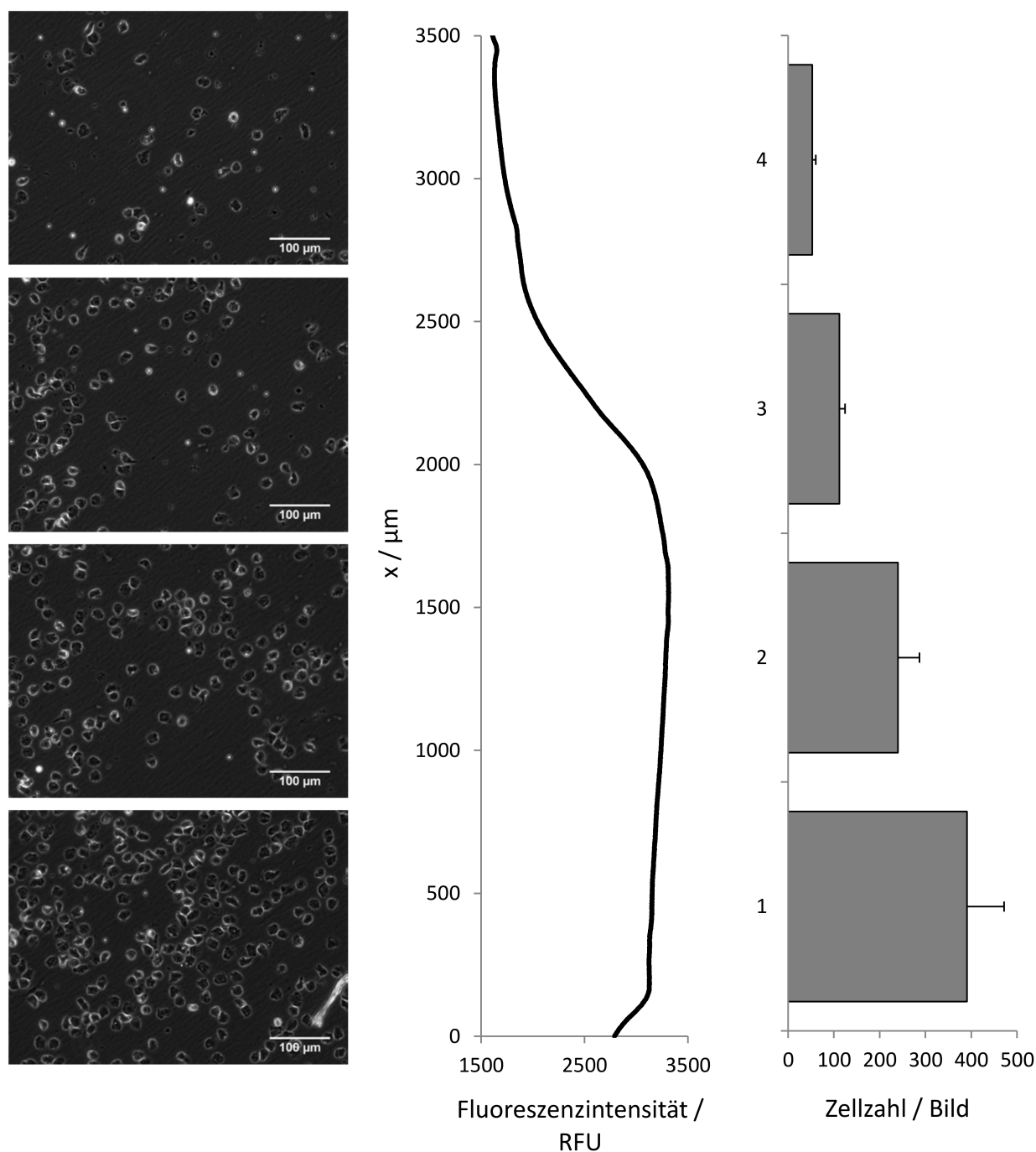


**Abbildung 5.50:** Adhärenter neutrophiler Granulozyt auf einer Petrischalenoberfläche. Die Zelle ist nicht polarisiert, flach und ausgebreitet auf der Oberfläche. Bildung von Lamellipodien ist erkennbar und durch Pfeile angedeutet. Vergrößerung: 36x. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Die Bildung von Lamellipodien konnte beobachtet werden (Pfeile), was auf eine Aktivierung der Zellen schließen ließ. Einige Zellen zeigten Haptokinese, d.h. sie migrierten ziellos, jedoch blieben sie innerhalb eines Radius von 15  $\mu\text{m}$ , ohne dabei eine Vorzugsrichtung aufzuzeigen. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Oberflächen bestand darin, dass sich einige Zellen während des Experiments von der Agaroseschicht lösten und wieder in Suspension gingen. Die beiden Oberflächen schienen eine gewisse Aktivierung der Zellen auszulösen, vor allem die Adhäsion, die ein untypisches Verhalten von Suspensionszellen ist. Die Oberflächen lösten jedoch keine gerichtete Migration bei den Neutrophilen aus.

Im Anschluss an die Kontrollversuche wurde das Zellverhalten auf den beiden mit verschiedenen Methoden hergestellten IL-8 Gradienten untersucht. Die Zellen wurden dazu für 30 min bei 37 °C auf der Oberfläche inkubiert und nicht adhärenente Zellen wurden abgenommen. Anschließend wurde das Zellverhalten über eine Zeitspanne von 3 h im Mikroskop mit einem Bild pro Minute beobachtet. Die Zellen adhärten auf beiden IL-8 Gradienten, jedoch war eine unterschiedliche Reaktion auf die Gradienten sichtbar. Auf dem nach der modifizierten Methode hergestellten Gradienten mit 2 h Diffusionszeit wurden zwar adhärenente Zellen beobachtet und auch zeigte sich eine Aktivierung der Zellen durch Bildung von Lamellipodien, jedoch war keine Migration entlang des Gradienten zu erkennen. Das Zellverhalten unterschied sich nicht merklich von dem der Zellen auf der Petrischale oder reiner Agarose. Auf dem steileren IL-8 Gradient nach 75 min Diffusionszeit (nach der Methode von Mayer *et*

al.) hingegen adhärerten Neutrophile auf der IL-8 Oberfläche abhängig von der immobilisierten IL-8 Menge (Abbildung 5.51).



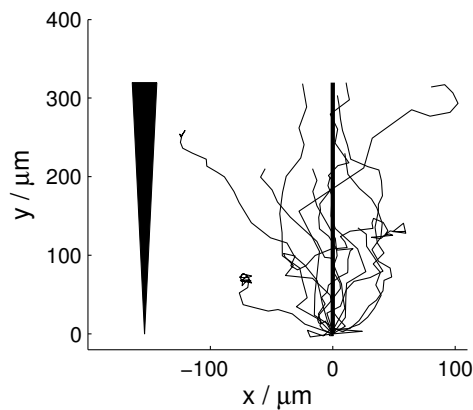
**Abbildung 5.51:** Zelladhäsion auf dem sigmoidalen IL-8 Gradienten nach der Methode von Mayer *et al.* gestempelt nach 75 min Diffusionszeit. Links: Neutrophile Granulozyten erkennen den Gradienten. Die Zellzahl nimmt mit steigender IL-8 Konzentration zu. Vergrößerung: 16x. Maßstab: 100 µm. Mitte: Profil des Fluoreszenzbildes des IL-8 Gradienten nach 75 min Diffusionszeiten zur Darstellung des Gradientenverlaufs. Rechts: Mittelwert der Zellzahl pro Bild ± SEM (n = 3). (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

---

Je mehr IL-8 auf der Oberfläche immobilisiert war, umso größer war die Anzahl an adhären Zellen. Auf den beiden Plateaus des Gradienten war keine gerichtete Migration der Zellen beobachtbar, die Bildung von Lamellipodien war jedoch sichtbar. Im Bereich des linearen Verlaufs des Gradienten fand eine gerichtete Zellmigration in Richtung höherer IL-8 Konzentration statt. Die Chemotaxis ist abhängig von der Konzentration und weist dabei einen glockenförmigen Verlauf auf.<sup>[252,253,254]</sup> In zu kleinen oder zu großen Konzentrationsbereichen findet kaum Chemotaxis statt, was das Zellverhalten auf den beiden Plateaus vermutlich erklärte. Die Steigung des linearen Bereichs dieses Gradienten mit  $23 \pm 2 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  schien jedoch, im Gegensatz zu dem Gradienten nach der modifizierten Methode mit einer Steigung von  $0,008 \pm 7 \cdot 10^{-4} \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$ , im richtigen Bereich für Neutrophile zu liegen. Auch die absolute IL-8 Beladung von  $15,9 \pm 1 \text{ ng mm}^{-2}$  schien geeignet für Neutrophile. Durch die ausgelöste Migration konnte ebenfalls darauf geschlossen werden, dass das Protein in einer aktiven Form auf der Oberfläche immobilisiert vorlag und, dass die Steigung und der Verlauf des Gradienten von Zellen als solcher erkannt werden können. Nachdem sich die hergestellten Gradienten als geeignet für die Untersuchung der Haptotaxis von Neutrophilen herausgestellt hatten, folgten Versuche zum haptotaktischen Verhalten von Neutrophilen auf den immobilisierten IL-8 Gradienten (Methode nach Mayer *et al.* nach 75 min Diffusionszeit).

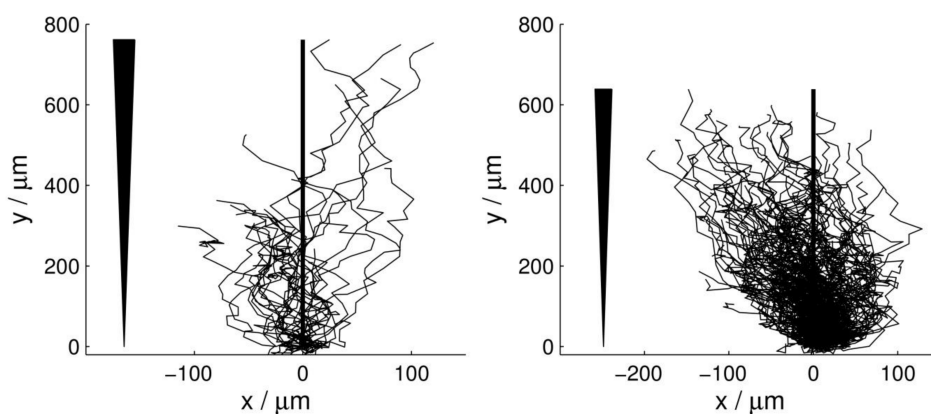
### Statistische Auswertung des haptotaktischen Verhaltens

Für Haptotaxisversuche wurde zunächst der Bereich zwischen 2000 und  $2500 \mu\text{m}$  des Gradienten im Mikroskop über 3 h beobachtet, da in diesem Bereich eine Steigung der IL-8 Konzentration trotz diffundierendem IL-8 über die Dauer des Experiments erhalten blieb. Anfangs wurden eine Fläche von  $448 \cdot 336 \mu\text{m}^2$  und ein Bild pro 5 min aufgenommen. Diese Parameter stellten sich jedoch als ungeeignet heraus, da einige Zellen während des dreistündigen Experiments aus dem Bildfeld heraus migrierten. Auch waren die erhaltenen Migrationspfade sehr grob, da die Migrationsgeschwindigkeit relativ hoch war. Ein Bild alle 5 min reichte also nicht aus. Dennoch war anhand dieser Daten eine gerichtete Migration der Zellen entlang des Gradienten zu erkennen. Zur Auswertung der Haptotaxis wurden die Migrationspfade jeder einzelnen Zelle innerhalb der Zeitintervalle mit der Software ImageJ und dem Plugin MTrackJ verfolgt. So wurden x- und y-Koordinaten für jeden einzelnen Punkt aller Migrationspfade der einzelnen Zellen ermittelt, die anschließend in einem 2D-Plot aufgetragen wurden (MATLAB). Diese sogenannten Zelltrajektorien zeigten die Richtung der Zellmigration eines Experiments, wobei alle Trajektorien den Startpunkt im Ursprung des Koordinatensystems haben. Da der Gradient während des Experiments aus technischen Gründen nicht perfekt entlang der y-Achse justierbar ist, wurde die Richtung des Gradienten für jedes individuelle Experiment auf der y-Achse angepasst. Dazu wurden die erhaltenen Zellvektoren eines Experiments derart rotiert, dass der Winkel des mittleren Migrationsvektors aller Zelltrajektorien mit der y-Achse Null wurde. Diese modifizierten Daten wurden als Grundlage für alle weiteren Analysen verwendet. In Abbildung 5.52 sind die Migrationstrajektorien des ersten Experiments dargestellt. Sie zeigen eindeutig eine bevorzugte Migration der Zellen in y-Richtung, entlang des Gradienten, und nur wenig Migration in x-Richtung. Auch waren kaum Zellpfade zu beobachten, die eine Migration entgegen des Gradienten anzeigten. Es ist kaum ungerichtete Migration, sogenannte Haptokinese, zu beobachten.



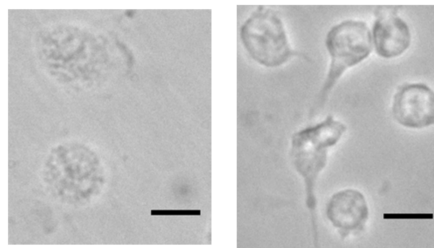
**Abbildung 5.52:** Migrationstrajektorie des ersten Haptotaxisexperiments. Die Richtung des Gradienten ist durch das Dreieck dargestellt, dass in Richtung höherer IL-8 Konzentrationen breiter wird. Messparameter: 5 min Intervalle. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

Die Parameter für die Haptotaxisversuche wurden in den Folgeversuchen auf ein visuelles Feld einer Fläche von  $895 \cdot 671 \mu\text{m}^2$  mit Zeitintervallen von 60 s zwischen den Bildern angepasst. Die Zeitspanne des Experiments wurde bei 3 h belassen. Diese Anpassung resultierte in einer deutlich besseren Auflösung der Zellmigration (Abbildung 5.53), erkennbar an den feineren Pfaden für die einzelnen Zellen. Auch migrierten keine Zellen mehr aus dem Bildfeld heraus. Diese beiden Experimente zeigten ebenfalls eindeutige Haptotaxis der Neutrophilen entlang der IL-8 Gradienten und auch hier war kaum Haptokinese zu beobachten. Die Zellmigration verlief sehr geradlinig in Richtung höherer Konzentrationen an IL-8. Auffällig war dabei, dass im dritten Experiment die Zellzahl deutlich höher war, als bei den beiden vorangegangenen Experimenten. Es wurde keine definierte Zellzahl auf den Gradienten gegeben und so kamen vermutlich die Unterschiede zustande.



**Abbildung 5.53:** Migrationstrajektorien des zweiten und dritten Haptotaxisexperiments. Die Richtung der Gradienten ist durch das Dreieck dargestellt, dass in Richtung höherer IL-8 Konzentrationen breiter wird. Messparameter: 1 min Intervalle. (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

Der Anteil migrierender Zellen an der Gesamtzahl an adhärenenten Zellen betrug ca. 30 % für die ersten beiden Experimente und 50 % für das dritte Experiment. Die nicht migrierenden Zellen adhärenierten zwar auf der Oberfläche, sie zeigten jedoch keine Polarisierung des Zellkörpers. Lediglich einige Lamellipodien konnten beobachtet werden, die die Umgebung um die jeweilige Zelle herum abtasteten. Im Vergleich zu den adhärenenten Zellen auf der Petrischalenoberfläche (Abbildung 5.54, links) waren diese Zellen etwas kugelig und weniger ausgebreitet (Abbildung 5.54, rechts). Die migrierenden Zellen hingegen konnten auch auf Einzelzellbildern eindeutig identifiziert werden. Ihre Polarisierung, die Bildung des Lamellums im vorderen Bereich und des Uropods im hinteren Bereich der Zelle, waren charakteristisch.

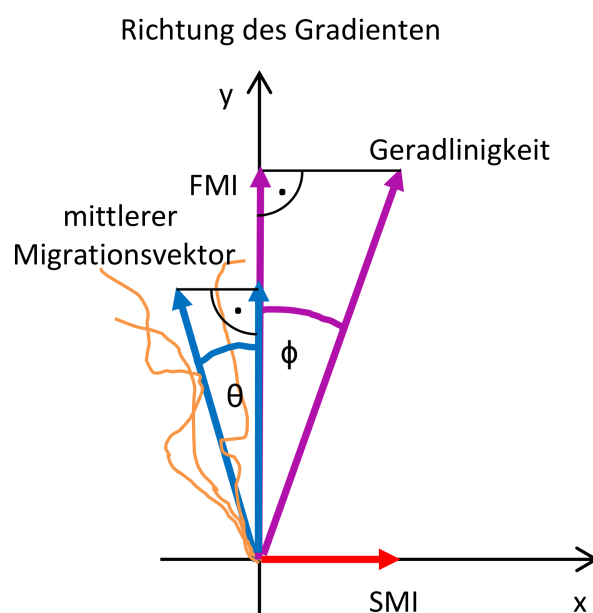


**Abbildung 5.54:** Neutrophile Granulozyten auf einer Petrischalenoberfläche und während eines Haptotaxisexperiments auf dem IL-8 Gradienten. Links: Neutrophile Granulozyten auf der Petrischalenoberfläche sind nicht polarisiert, dafür aber flach und ausgebreitet. Die Bildung von Lamellipodien ist erkennbar. Rechts: Migrierende und nicht migrierende neutrophile Granulozyten auf einem IL-8 Gradient. Migrierende Zellen sind polarisiert mit einer Vorderflanke gekennzeichnet durch Lamellipodien gefolgt vom Zellkörper und dem Uropod. Nicht migrierende Zellen zeigen keine Polarisierung. Der IL-8 Gradient verläuft von unten nach oben. Vergrößerung: 36x. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . (Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

Es wurde ein Rayleigh-Test für die Bewertung der Verteilung der Migrationsvektoren in einem Einheitskreis durchgeführt.<sup>[215]</sup> Dieser liefert als Hypothesentest Informationen über eine Vorzugsrichtung der Migration. Unter der Annahme, dass lediglich ein Konzentrationsgradient gerichtete Migration verursacht, ist die Widerlegung der Nullhypothese einer Migration entlang eines Konzentrationsgradienten gleichgesetzt, da in der Berechnung (Kapitel 4.5) die Annahme gemacht wird, dass diese Vorzugsrichtung dem Gradienten entspricht. Der Rayleigh-Test ergab für alle drei Experimente Werte für  $p < 0,001$ , die eine deutliche Vorzugsrichtung entlang des Gradienten anzeigen. Um die erhaltenen Daten bezüglich der Stärke der Migration entlang des IL-8 Gradienten zu bewerten, wurde eine geeignete Bewertungsgrundlage gesucht. In der Literatur findet sich eine Reihe von Chemotaxisindices, die die Vorzugsrichtung der Chemotaxis und die Abweichung davon bewerten. Haptotaxis kann äquivalent dazu ausgewertet werden, da auch die Auswertung der Chemotaxis von einem zweidimensionalen System ausgeht. Im Folgenden werden zunächst gängige Chemotaxisindices diskutiert. Dabei wird immer davon ausgegangen, dass die y-Achse der Zelltrajektorien mit der Gradientenrichtung übereinstimmt.

Agrawal *et al.*<sup>[255]</sup> und Tharp *et al.*<sup>[256]</sup> verwenden den Kosinus des Winkels  $\theta$  als Chemotaxisindex, der sich aus dem Quotienten der Länge des Vektors in Gradientenrichtung und der Verbindung

von Start- und Endpunkt der Zelle (Länge des Vektors der Migrationsrichtung) ergibt (Abbildung 5.55, Gleichung (5.2)). Dieser Wert bewegt sich zwischen +1 und -1, wobei +1 perfekter Migration entlang des Gradienten entspricht und damit die Linie zwischen Start- und Endpunkt parallel zum Gradienten verläuft.<sup>[257,258]</sup> Es ergeben sich zwei Nachteile bei der Verwendung dieses Index. Zum einen muss die Richtung des Gradienten exakt definiert sein, da sich sonst größere Fehler ergeben. Zum anderen basiert die Bewertung der Chemotaxis auf der Annahme kleiner Winkel, die nicht zwingend Chemotaxis entsprechen müssen. Schwache Migration in y-Richtung kann ebenfalls in einem kleinen Winkel  $\theta$  resultieren und es wird fälschlicherweise von starker Chemotaxis gesprochen. Auch im Fall von Chemokinese kann der Winkel gegen Null gehen und der Kosinus wird 1. Dieser Index ist somit weder zur Einschätzung, ob Chemotaxis vorliegt, noch zur Quantifizierung von Chemotaxis geeignet.



**Abbildung 5.55:** Chemotaxisindices. Das Vektorbild zeigt die Parameter zur Berechnung von  $\cos(\theta)$ , des *FMI*, des *SMI*, der *Geradlinigkeit* und des *CPI*. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)

$$\cos(\theta) = \frac{\text{Länge des Vektors in Gradientenrichtung}}{\text{Länge des mittleren Migrationsvektors}} \quad (5.2)$$

Der *Forward Migration Index (FMI)* findet breite Verwendung in der Literatur zur Auswertung von Chemotaxis.<sup>[63,123,216,259]</sup> Er gibt den Migrationsanteil in y-Richtung (Richtung des Gradienten) im Verhältnis zur zurückgelegten Gesamtstrecke der Zellen an (Gleichung (5.3)). Somit betrachtet dieser Index ausschließlich die Migration in Richtung des Gradienten und vernachlässigt dabei die Migrationsanteile senkrecht zur Gradientenrichtung. Die Migration kann gleichermaßen in x- und y-Richtung



stattfinden, womit noch relativ hohe y-Migrationsanteile (50 % der Gesamtmigration) erhalten werden, und dieser Index würde ein positives Ergebnis für Chemotaxis darstellen.

$$FMI_j = \frac{y_{end} - y_1}{l_i} \quad FMI = \sum_{j=1}^J \frac{FMI_j}{J} \quad (5.3)$$

$$\text{mit } l_i = \sum_{i=2}^{n_{\text{Schritte}}} \left( (x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5.4)$$

Ein ähnliches Problem entsteht bei der Verwendung der *Geradlinigkeit* als Chemotaxisindex (Gleichung (5.5)).<sup>[260]</sup> Die *Geradlinigkeit* gewichtet die Migration in y- und x-Richtung gleichermaßen und es werden nur Informationen über das Verhältnis der Gesamtstrecke zur direkten Verbindung vom Anfangs- zum Endpunkt erhalten.

$$Geradl._j = \frac{\left( (x_{end} - x_1)^2 + (y_{end} - y_1)^2 \right)^{\frac{1}{2}}}{l_i} \quad Geradl. = \sum_{j=1}^J \frac{Geradl._j}{J} \quad (5.5)$$

Es kann keine Aussage über die Zellmigration entlang eines Gradienten getroffen werden. Im Fall einer komplett linearen Migration entlang des Gradienten wären sowohl der *FMI* als auch die *Geradlinigkeit* gleich 1. Jedoch zeigt ein hoher *FMI*-Wert nicht zwingend Chemotaxis entlang des Gradienten. Ein Wert von 0,7 für den *FMI* und 1 für die *Geradlinigkeit* ergeben einen sehr hohen Wert von 0,7 für den *SMI*, also für Migration in x-Richtung, senkrecht zum Gradienten (Gleichung (5.6)). Die Migrationsrichtung verlief in diesem Fall in einem 45° Winkel zum Gradienten.

$$SMI_j = \frac{x_{end} - x_1}{l_i} \quad SMI = \sum_{j=1}^J \frac{SMI_j}{J} \quad (5.6)$$

Dies zeigt die Notwendigkeit, die x-Richtung ebenfalls in den Chemotaxisindex miteinzubeziehen. Nur hohe Werte für die *Geradlinigkeit* und den *FMI* zusammen mit niedrigen Werten für den *SMI* zeigen eine starke Chemotaxis entlang eines Gradienten an. Beide Indices, *FMI* und die *Geradlinigkeit*, enthalten wichtige Informationen, jedoch nicht über die Präzision, mit der die Zellen einem gegebenen Gradienten folgen.

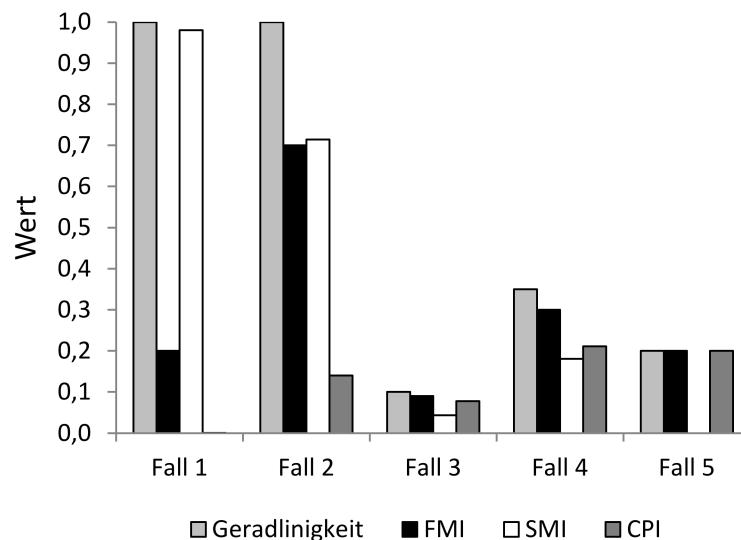
Der Chemotaxiskoeffizient basierend auf dem Keller-Segel-Modell für Chemotaxis ist sehr detailliert.<sup>[261] [176]</sup> Er beinhaltet die Konzentration des Chemoattraktants, die Steilheit des Gradienten und weitere zellabhängige Parameter, durch welche Chemotaxis beschrieben werden kann. Der Koeffizient ist sehr nützlich, jedoch nicht praktisch, da zur Bestimmung das genaue experimentelle Setup bekannt sein muss. Somit ist es auch nicht zum Vergleich verschiedener Chemotaxisassays geeignet.

Um eine genauere Aussage über die chemotaktische Präzision, mit der sich Zellen entlang eines Gradienten bewegen, treffen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Jan Rink, M.Sc., ein alternativer Chemotaxisindex, der *Chemotaxis Precision Index (CPI)*, entwickelt. Dieser Index ergibt sich aus dem Kosinus des Winkels  $\phi$  zwischen dem Richtungsvektor des Gradienten und der direkten Verbindungslinie zwischen Anfangs- und Endpunkt der mittleren Trajektorie aller Zellen, multipliziert mit dem *FMI* und dem Betrag von 1 minus dem *SMI* (Abbildung 5.55, Gleichung (5.7)).

$$CPI = \cos(\phi) \cdot FMI \cdot (1 - |SMI|) = \frac{FMI^2}{Geradlinigkeit} \cdot (1 - |SMI|) \quad (5.7)$$

Präzise migrierende Zellen wandern einen Pfad mit einem möglichst kleinen Winkel  $\phi \approx 0^\circ$  ( $\cos(\phi) \approx 1$ ), einem hohen y-Anteil  $FMI \approx 1$ , einer möglichst direkten *Geradlinigkeit*  $\approx 1$  und einem kleinen  $SMI \approx 0$ , woraus sich ein  $CPI \approx 1$  ergibt. Ist die Lage des Gradienten exakt bekannt, kann der Winkel  $\phi$  gegen den Winkel  $\theta$  <sup>[255,256,257,258]</sup> ausgetauscht werden. Handelt es sich um Chemokinese, nimmt der Winkel  $\phi$  einen beliebigen Wert an und ist im Mittel Null, während der *FMI* und der *SMI* niedrig sind und somit wird auch der *CPI* niedrig sein. Mithilfe dieses Wertes für den *CPI*, der zwischen 0 und 1 liegt, ist eine einfache und intuitive Quantifizierung von chemotaktischem oder haptotaktischem Verhalten von Zellen möglich.

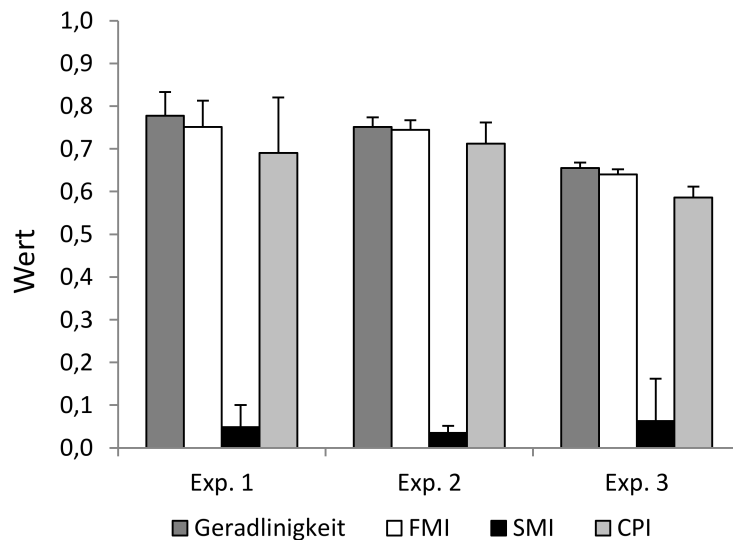
Um die Schwachstellen des *FMI* und der *Geradlinigkeit* als Chemotaxisindex im Vergleich zum *CPI* darzulegen, werden im Folgenden Grenzfälle dieser Indices aufgezeigt und diskutiert (Abbildung 5.56). Fall 1 zeigt eine *Geradlinigkeit* von 1 und einen *FMI* von 0,2, woraus ein *SMI* von 0,98 und ein *CPI* von 0,0008 resultieren. Anhand dieses Falls wird klar, dass die *Geradlinigkeit* allein keine Aussage über Chemotaxis zulässt, da die Migration in x-Richtung den größeren Anteil an der Migration haben kann. In diesem Fall verlief die Chemotaxis senkrecht zum Gradienten. Auch zeigen diese Daten, dass ein *FMI* von 0,2, wie er von Lin *et al.* <sup>[123]</sup> publiziert wurde, nicht zwingend ein Beleg für Chemotaxis sein muss, auch wenn dieser Wert es nicht ausschließt. Der zweite Fall zeigt eine *Geradlinigkeit* von 1 und einen *FMI* von 0,7, was auf den ersten Blick sehr gute Werte sind, da die Zellen scheinbar sehr genau in eine Richtung migrieren mit einem sehr hohen y-Anteil. Diese Konstellation weist jedoch einen *SMI* von 0,7 auf und die Migrationsrichtung liegt somit im  $45^\circ$  Winkel zum Gradienten und es kann ebenfalls nicht von Chemotaxis entlang eines gegebenen Gradienten gesprochen werden. Der *CPI* spiegelt dies deutlich wieder, da er nur einen Wert von 0,14 annimmt. Fall 3 zeigt, dass niedrige Werte der *Geradlinigkeit* in niedrigen Werten für sowohl den *FMI* als auch den *SMI* resultieren. In diesem Grenzfall liegt keine Chemotaxis vor, was durch einen ebenfalls niedrigen Wert des *CPIs* angezeigt wird. Im vierten Fall nimmt die *Geradlinigkeit* einen Wert von 0,35 an, wie in der Arbeit von Sackmann *et al.* <sup>[260]</sup> beschrieben. Zusammen mit einem *FMI* von 0,3 resultiert ein *SMI* von 0,18. In diesem Fall liegt Chemotaxis vor, jedoch ist sie relativ schwach ausgeprägt und der *CPI* kommt an seine Grenzen. Mit einem Wert von 0,21 kann nur schwer von Chemotaxis gesprochen werden. Ebenso im letzten Fall, in dem mit niedrigen Werten der *Geradlinigkeit* (0,2) und des *FMI* (0,2) sowie einem *SMI* von 0 für den *CPI* einen Wert von 0,2 erhalten wird. Auch in diesem Fall liegt Chemotaxis vor, die jedoch zu schwach ausgeprägt ist, um sie quantifizieren zu können.



**Abbildung 5.56:** Mögliche Grenzfälle für die Quantifizierung der Chemotaxis durch literaturbekannte Indices wie der *Geradlinigkeit*, *FMI* und *SMI* sowie die für diese Fälle erhaltenen Werte des *CPIs*. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. 2015. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

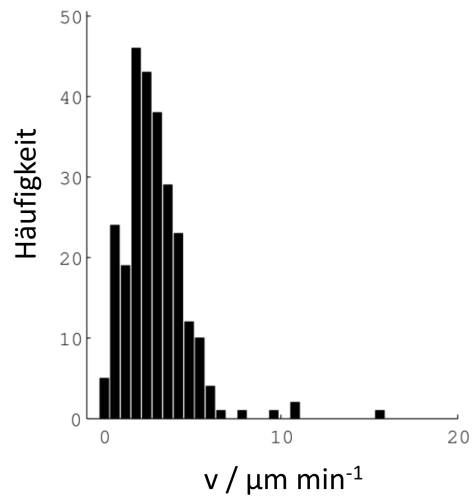
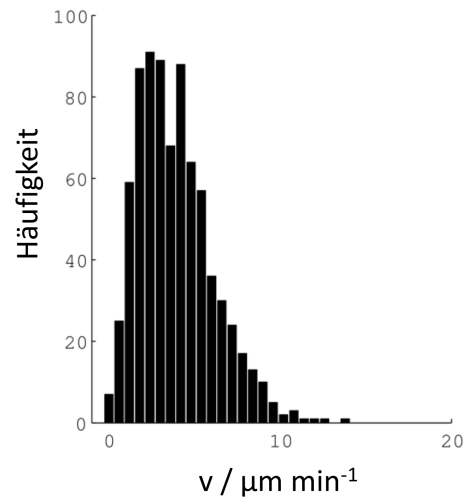
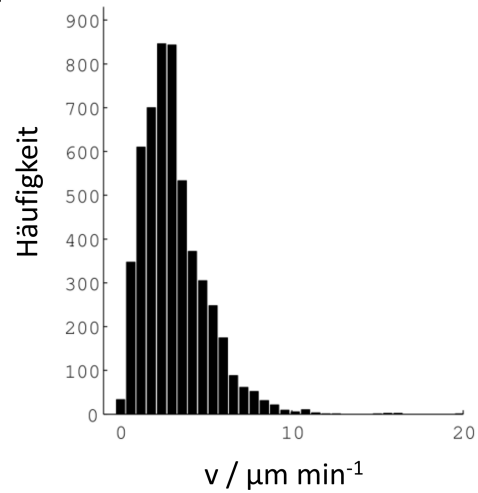
Der *CPI* weist einige Vorteile gegenüber den in der Literatur beschriebenen Indices auf. Dadurch, dass er in einem Bereich zwischen 0 und 1 liegt, ist es sehr einfach, die erhaltenen Ergebnisse zu evaluieren und die Präzision, mit der sich Zellen entlang eines gegebenen Gradienten bewegen, einzuschätzen. Hohe Werte weisen auf eine starke chemotaktische Antwort hin, während kleine Werte schwache Chemotaxis aufzeigen und Hinweise auf Chemokinese liefern. Weiterhin ist dieser Index unabhängig vom zugrunde liegenden Assay, sofern die benötigten Parameter (*Geradlinigkeit*, *FMI* und *SMI*) berechnet werden können. Somit kann das Zellverhalten aus verschiedenen Assays miteinander verglichen werden. Der *CPI* hat jedoch im Fall von schwacher migratorischer Antwort auch seine Grenzen. In diesem Fall sollte ein alternatives Zellsystem oder Migrationssystem gewählt werden.

Nachdem nun ein geeignetes Verfahren zur Quantifizierung des haptotaktischen Verhaltens gefunden wurde, konnten die Daten aus den drei Haptotaxisexperimenten evaluiert werden. Anhand der Zelltrajektorien konnten die benötigten Migrationsparameter, die *Geradlinigkeit*, der *FMI*, der *SMI* sowie der *CPI*, für die drei Versuche bestimmt werden (Abbildung 5.57). Für alle Experimente sind die *Geradlinigkeit*, der *FMI* und der *CPI* sehr hoch und im Vergleich dazu ist der *SMI* sehr niedrig. Die *Geradlinigkeit* mit Werten zwischen  $0,66 \pm 0,01$  und  $0,78 \pm 0,06$  zeigt, dass die Zellen relativ direkt entlang einer Vorzugsrichtung migriert sind. Der *FMI* gibt den y-Anteil der Migration entlang des IL-8 Gradienten an und zeigt mit Werten zwischen  $0,64 \pm 0,01$  und  $0,75 \pm 0,06$ , dass die Hauptrichtung der Migration entlang des Gradienten lag. Der *SMI*, dessen Werte zwischen  $0,05 \pm 0,05$  und  $0,06 \pm 0,01$  liegen, gibt an, dass die Zellen kaum senkrecht zum Gradienten migrieren. Der *CPI*, der die chemotaktische Präzision angibt, mit der Zellen entlang eines gegebenen Gradienten migrieren, weist ebenfalls hohe Werte auf. Diese liegen zwischen  $0,59 \pm 0,03$  und  $0,71 \pm 0,05$  und zeigten somit eindeutige Haptotaxis der Zellen entlang des IL-8 Gradienten.

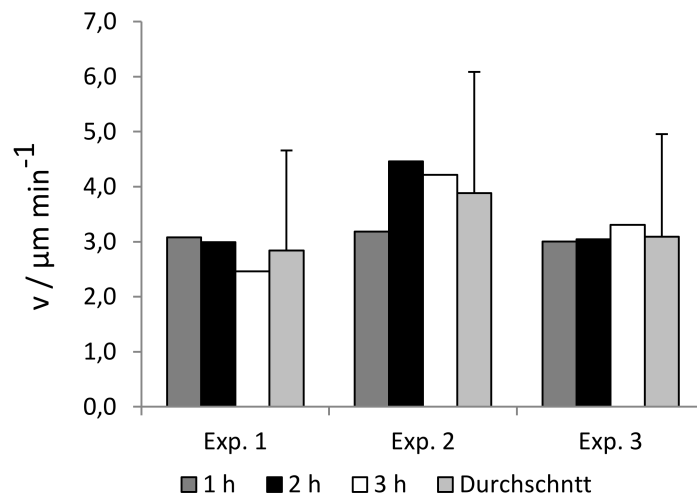


**Abbildung 5.57:** Migrationsparameter der drei unabhängigen Haptotaxisversuche. Werte  $\pm$  Standardabweichung für die Geradlinigkeit, den FMI, den SMI sowie den CPI. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015.** *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

Die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen liefert Informationen über die Stärke der chemotaktischen oder haptotaktischen Antwort. Um diese Informationen zu erhalten, wurden die Geschwindigkeiten der Zellen berechnet und daraus Geschwindigkeitsverteilungen der drei Experimente erstellt (Abbildung 5.58). Die Geschwindigkeiten lagen in allen drei Fällen zwischen 0 und  $10 \mu\text{m min}^{-1}$ . Dabei waren die Verläufe der Histogramme vergleichbar und die Maxima lagen jeweils zwischen 3 und  $4 \mu\text{m min}^{-1}$ . Anhand dieser Daten wurde die mittlere Geschwindigkeit innerhalb eines Experimentes aller Zellen berechnet. Um den Einfluss des diffundierenden IL-8 von der Oberfläche zu bestimmen, wurden zusätzlich die Migrationsgeschwindigkeiten der ersten, zweiten und dritten Stunde jedes Experimentes erstellt (Abbildung 5.59). Die mittleren Geschwindigkeiten lagen jeweils zwischen 3 und  $4 \mu\text{m min}^{-1}$  und zeigten mit Standardfehlern von ungefähr  $2 \mu\text{m min}^{-1}$  sehr große Abweichungen. Bei Betrachtung der Geschwindigkeitsverteilungen war dies jedoch zu erwarten, da die Migrationsgeschwindigkeiten bekanntermaßen einen breiten Bereich aufweisen. Für alle drei Experimente konnten Maximalgeschwindigkeiten von 10 bis  $15 \mu\text{m min}^{-1}$  beobachtet werden, die somit deutlich über den mittleren Geschwindigkeiten lagen und auch nur von vereinzelt Zellen erreicht wurden. Es konnte kein zeitabhängiger Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die Werte variierten zwar, jedoch änderten sie sich nicht signifikant und es war auch kein einheitlicher Trend erkennbar. Somit hatte das Diffundieren des IL-8 von der Oberfläche keinen großen Einfluss auf die Haptotaxis und es blieb ausreichend viel IL-8 auf der Oberfläche immobilisiert.

**Exp. 1****Exp. 2****Exp. 3**

**Abbildung 5.58:** Histogramme der Migrationsgeschwindigkeiten in den drei unabhängigen Haptotaxisexperimenten. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] *The American Association of Immunologists, Inc.*)



**Abbildung 5.59:** Migrationsgeschwindigkeiten der ersten, zweiten und dritten Stunde während der drei Haptotaxisexperimente sowie die mittlere Geschwindigkeit  $\pm$  SEM. (Modifiziert nach der Originalveröffentlichung in *The Journal of Immunology*. I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz. **2015**. *A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients*. *J. Immunol.* 194: 5549-5558. Copyright ©[2015] The American Association of Immunologists, Inc.)

---

## 6 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung und Entwicklung von Chemotaxisassays, um einerseits Chemokininhibitoren zu charakterisieren sowie im *High-Throughput Screening* (HTS) nach neuen suchen zu können und andererseits Einflussfaktoren auf die Haptotaxis testen zu können. Dazu wurde zunächst das rekombinant hergestellte Chemokin IL-8 auf seine strukturellen und funktionellen Eigenschaften hin untersucht, um einen aktiven Chemoattraktanten für die Assays zur Verfügung zu haben. Neutrophile Granulozyten wurden als responsives Zellsystem für IL-8 verwendet. Da die Handhabung sehr aufwendig und kompliziert ist, wurde außerdem nach einem alternativen Zellsystem gesucht. Dazu wurden verschiedene Endothel- und mit CXCR1 transfizierte HEK293-Zellen auf ihre chemotaktische Antwort auf IL-8 untersucht. Es wurden verschiedene Assays hinsichtlich ihrer Eignung zum Test von Chemokininhibitoren auf die Chemotaxis und Aktinpolymerisation überprüft. Für diese Untersuchungen wurde das Inhibitorpeptid IL8RPLoops<sup>[230]</sup>, das IL-8 mit einem  $K_D$  von  $0,5\mu\text{M}$  bindet, und ein anti-IL-8 Antikörper verwendet. Als besonders vielversprechende Option wurde ein neuer Assay in lebenden Zellen für die Aktinpolymerisation entwickelt. Darüber hinaus wurden auch Assays zur Untersuchung des chemotaktischen Verhaltens auf Einzelzellebene etabliert und entwickelt. Es wurde das weit verbreitete System der Mikrofluidik verwendet, um lösliche Chemokingradienten herzustellen. Schließlich wurde ein Haptotaxisassay entwickelt, der die Untersuchung des Verhaltens einzelner Zellen auf oberflächengebundenen Chemokingradienten erlaubt. Weiterhin wurde ein neuer Chemotaxisindex, der *Chemotactic Precision Index* (CPI), zur Bestimmung der Präzision, mit welcher eine Zelle entlang eines gegebenen Gradienten migriert, eingeführt.

---

### 6.1 Charakterisierung von Chemokinen und Chemokin responsiven Zellen

---

---

#### 6.1.1 Charakterisierung des Chemokins Interleukin-8 und Derivaten

---

Die Überprüfung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften des in dieser Arbeit verwendeten Chemokins IL-8 war notwendig, bevor mit der eigentlichen Assayentwicklung begonnen werden konnte. Die Faltung des CXG-Chemokins ist aufgrund der vier Cysteine bei der rekombinanten Herstellung in *E. coli* kritisch, da die richtigen Disulfidbrücken ausgebildet werden müssen. In Zusammenarbeit mit Dr. Dorothea Helmer wurde die korrekte Faltung des in unseren Laboren hergestellten IL-8 mittels CD-Spektroskopie überprüft und es konnte die native Faltung des rekombinant hergestellten Chemokins IL-8 nachgewiesen werden.<sup>[218,230]</sup>

Die genaue Konzentrationsbestimmung des Proteins stellte einen weiteren kritischen Punkt dar. Bislang wurde die Konzentration mit dem BCA-Assay bestimmt, in dem als Referenz Lysozym verwendet wurde. Durch gravimetrische Bestimmung einer relativ großen Menge an IL-8 (ca. 30 mg) konnte eine Stammlösung mit genauer Konzentration hergestellt werden, mithilfe derer durch Messung der

---

Absorption bei 280 nm eine Kalibriergerade erstellt wurde. Beim Vergleich der Konzentrationsbestimmung von BCA-Assay und Absorption bei 280 nm wurde festgestellt, dass die mit dem BCA-Assay ermittelten Werte um 80 % von den tatsächlichen Werten abweichen. Diese Abweichung war leider nicht reproduzierbar, sodass kein Zusammenhang zwischen der tatsächlichen IL-8 Konzentration und der mit dem BCA-Assay bestimmten aufgezeigt werden konnte. Der BCA-Assay ist eine indirekte Art der Konzentrationsbestimmung, bei dem für jeden Versuch eine Kalibriergerade erstellt werden muss, sodass große Mengen an Protein benötigt werden. Aus diesem Grund konnte kein IL-8 zur Erstellung einer solchen Gerade verwendet werden und es wurde stattdessen auf Lysozym zurückgegriffen, da das normalerweise in BCA-Assays verwendete BSA in Größe und Eigenschaften zu sehr von IL-8 abweicht. Doch auch Lysozym erwies sich aufgrund der deutlich unterschiedlichen Aminosäureverteilung von Cysteinen, Tryptophan und Tyrosin im Vergleich zu IL-8 als ungeeignet. Für eine exakte Bestimmung der IL-8 Konzentration mittels Absorptionsmessung bei 280 nm sind einige Parameter entscheidend. Laut dem Lambert Beer'schem Gesetz gilt die Proportionalität der Konzentration zur Absorption nur in verdünnten Lösungen. Bei bekannter Schichtdicke kann der Extinktionskoeffizient berechnet werden, wodurch wiederum eine Bestimmung der Konzentration aufgrund der Absorptionswerte bei bekannter Schichtdicke und Extinktionskoeffizient möglich ist. Die Schichtdickenbestimmung in Mikrotiterplatten ist jedoch sehr ungenau, weshalb es für die Konzentrationsbestimmung genauer ist, mit den gleichen Volumina in der gleichen Platte ausgehend von einer Kalibriergerade zu messen. Die Schichtdicke der zu bestimmenden Lösung muss identisch mit der der Kalibriergeraden sein und auch der Puffer sollte sich nicht unterscheiden, da die Salzkonzentration, Viskosität und Oberflächenspannung die Form des Meniskus in den Kavitäten der Mikrotiterplatte und somit die Schichtdicke beeinflussen können. Dennoch liefert diese Methode deutlich genauere Werte und es sollte nicht mehr auf den BCA-Assay zurückgegriffen werden.

Die chemotaktische Aktivität des IL-8 wurde unter Verwendung eines Transwellassays überprüft. Dabei wurden sowohl Wildtyp IL-8 als auch die Mutante IL-8-S72C und verschiedene Konjugate getestet. Die Mutante diente dem Zweck, IL-8 mit Fluorophoren oder kleinen Molekülen wie Biotin zu versehen, um sie direkt ohne Antikörperfärbung nachweisen zu können oder sie auf Oberflächen zu immobilisieren. Jedes dieser Derivate sollte seinen chemotaktischen Einfluss auf Neutrophile behalten. Der Transwellassay konnte dies auch bestätigen. Es wurde für jedes Derivat von IL-8 eine vergleichbare chemotaktische Aktivität nachgewiesen. Der Anteil an migrierten Zellen bewegte sich zwischen 50 und 60 % und unterschied sich hoch signifikant von der Negativkontrolle mit nur ca. 10 % Migration. Somit war die chemotaktische Aktivität für sowohl das Wildtyp IL-8 als auch die Mutante und die beiden Varianten nachgewiesen und sie konnten für weitere Aktivitäts- und Migrationsversuche verwendet werden. In Bindungsstudien mit CXCR1 und CXCR2 sowie Rezeptorinternalisierungsassays konnten vergleichbare Aktivitäten der IL-8-S72C Konjugate zum Wildtyp nachgewiesen werden.<sup>[262,263]</sup>

Weiterhin sollte für Bindungsstudien ein <sup>15</sup>N-markiertes IL-8 rekombinant hergestellt werden. Ausgehend von dem für die IL-8 Expression verwendeten Expressionssystem im pET22b-Vektor in *E. coli* BL21 (DE3) RIL wurde ein Minimalmedium mit Ammoniumchlorid als einzige Stickstoffquelle für die Überexpression gewählt, dessen Verwendung allgemeine Anwendung findet<sup>[220,264]</sup> und bereits auch für IL-8 beschrieben wurde<sup>[234,265]</sup>. Das Heranzüchten der *E. coli* konnte im Rahmen dieser



---

Arbeit nicht in diesem Medium durchgeführt werden, da die Zellen ein sehr schlechtes Wachstum zeigten und anschließend keine Expression beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wuchsen sie zunächst in LB-Medium heran und erst nach Erreichen der gewünschten OD wurden sie in das Minimalmedium überführt. Anschließend wurden die Bakterien noch 2 h in diesem Medium kultiviert, bevor die Expression induziert wurde. So wurde sichergestellt, dass die Zellen ihren Stoffwechsel an das Minimalmedium anpassen,  $^{15}\text{N}$ -markiertes Ammoniumchlorid aufnehmen und ihre Stickstoffreserven verbrauchen. Dieses Vorgehen führte zu einer Überexpression des IL-8, jedoch erst bei längeren Inkubationszeiten als in normalem LB-Medium. In der Literatur werden zum Teil ebenfalls längere Inkubationszeiten in Minimalmedium beschrieben, da die Zellen stickstoffhaltige Biomoleküle aus Ammoniumchlorid aufbauen müssen und sie demnach unter nicht optimalen Bedingungen exprimieren.<sup>[265]</sup> Nach der Expression wurden der Zellaufschluss und die Reinigung analog zu IL-8 wt durchgeführt. Anhand einer SDS-PAGE konnte das Protein im Lysat nachgewiesen werden und auch die erfolgreiche Reinigung mittels einer Kationenaustauschchromatographie wurde gezeigt. Es wurden zwei reine Fraktionen erhalten, die zusätzlich über eine *reversed phase* Chromatographie gereinigt wurden. Auch dieses Chromatogramm zeigte ausschließlich einen Peak und bestätigte die Reinheit des Proteins. Anhand der LC-MS konnte hauptsächlich eine Masse von 8486 Da identifiziert werden, die der Masse von 8489 Da bei maximalem  $^{15}\text{N}$ -Einbau sehr nahe kommt. Da die Zellen während des Anwachsens in LB-Medium nicht-isotopenmarkierte Stickstoffquellen einbauen konnten und somit Reserven zur Verfügung hatten, wurde kein Einbau von 100 % des isotopenmarkierten Stickstoffs erwartet. Marley *et al.* schätzten anhand ihrer NMR-Daten einen Einbau von 90 % für  $^{15}\text{N}$ -Isotope, dabei verwendeten sie ein vergleichbares Expressionsprotokoll.<sup>[264]</sup> In dieser Arbeit wurde ein Einbau von 97 % erreicht. Die Ausbeute des isotopenmarkierten IL-8 betrug 6,6 mg pro Liter Zellkultur und entsprach somit fast 70 % der Ausbeute des Wildtyp IL-8 mit 10 mg pro Liter trotz der Expression in Minimalmedium.

Zusammenfassend erfüllte das rekombinant hergestellte IL-8 die Erwartungen an Struktur, Reinheit und Aktivität und konnte somit für weitere Experimente eingesetzt werden. Die Expression einer  $^{15}\text{N}$ -markierten Variante des IL-8 konnte erfolgreich durchgeführt werden.

---

### 6.1.2 Chemotaktische Reaktion von Endothel- und Epithelzellen auf IL-8

---

In diesem Teil der Arbeit wurden, auf der Suche nach einem alternativen IL-8 responsiven Zellsystem, verschiedene Zelltypen auf ihre chemotaktische Aktivität nach IL-8 hin untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene HEK293-Zelllinien, die beide mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1 stabil transfiziert worden waren, in Chemotaxisassays getestet. Da in der Literatur die Chemotaxis von verschiedenen Endothelzellen nach IL-8 beschrieben wird, wurden die beiden Endothelzelltypen HUVEC und ECFC ebenfalls auf Chemotaxis nach IL-8 untersucht.

Dazu war es erforderlich, den Transwellassays für adhärente Zellen anzupassen. Dies erfolgte zunächst in Anlehnung an Montuori *et al.*<sup>[226]</sup> und Kim *et al.*<sup>[227]</sup> mit den in Tabelle 5.2 aufgeführten Parametern. Resazurin wurde aufgrund der metabolischen Aktivität in Zellen zur Bestimmung der Zelldichte verwendet.<sup>[228,229]</sup> Der Mechanismus der Resazurinreduktion ist noch nicht vollständig verstanden. Es wurde sowohl in den Mitochondrien als auch im Nukleus von fixierten Zellen Resa-

zurin nachgewiesen, jedoch ist noch nicht geklärt, ob die Reaktion in der Zelle oder im Medium stattfindet.<sup>[229]</sup> Es gestaltete sich als schwierig, die Chemotaxis der adhären Zellen nachzuweisen, sodass anfänglich in allen Versuchen die Zellzahlen der Negativ- und Positivkontrollen gleich waren. Problematisch war vor allem die Unterscheidung der adhären Zellen auf der Ober- und Unterseite der Membran, woraus sehr hohe Zellzahlen in der Negativkontrolle resultierten. Zusätzlich war die zu Beginn gewählte Konzentration an Resazurin zu gering und demnach das Verfahren nicht sensitiv genug. Zu geringe Konzentrationen resultierten in einer zu geringen dynamischen Breite und die verschiedenen Zellzahlen konnten nicht signifikant voneinander unterschieden werden, insbesondere, wenn bei höheren Zellzahlen das Resazurin in der gegebenen Zeit vollständig umgesetzt wird. Die Bestimmung der Abhängigkeit des Resazurinumsatzes von Konzentration und Zellzahl half bei der Optimierung und es wurde eine 40fach höhere Konzentration als optimal identifiziert, die weiterhin verwendet wurde. Nach Anpassung der Resazurinkonzentration wurde erstmals ein signifikanter Unterschied zwischen der Positiv- und Negativkontrolle erhalten und die Ergebnisse lieferten einen ersten Hinweis auf Chemotaxis der HEK293-CXCR1. In vielen Folgeversuchen blieben die Negativkontrollen mit bis zu 45 % Migration sehr hoch. Ähnliche Beobachtungen mit HEK293-Zellen finden sich in der Literatur<sup>[266]</sup>, wobei die Chemotaxis meist nicht in prozentualer Migration zur absoluten Zellzahl, sondern normiert auf die Negativkontrolle angegeben wird<sup>[226,267]</sup>, wodurch diese Information verloren geht. Durch ihre Natur, adhären zu wachsen, scheint ein signifikanter Teil der Zellen im Lauf der Inkubation unspezifisch an die Membran zu adhären. Hingegen schien aber auch der chemotaktische Effekt des IL-8 auf die HEK293-CXCR1 zu gering, um in der gewählten Zeit größere Unterschiede aufzuzeigen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit resultierte nicht in einer größeren, nach IL-8 migrierenden Zellzahl. Die chemotaktische Aktivität der Zellen ist zum einen durch die Rezeptoren auf der Zelloberfläche limitiert und zum anderen durch ihre eingeschränkte Fähigkeit zur Migration, da die Chemotaxis von HEK293-Zellen im Gegensatz zu Leukozyten einen deutlich langsameren Prozess *in vivo* darstellt. Um nachzuweisen, dass der beobachtete Effekt spezifisch für IL-8 war, wurde ein Antikörper gegen IL-8 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass bei Bindung von IL-8 durch den Antikörper die Migration deutlich verringert wurde. Somit war nachgewiesen, dass die Zellen in der Lage sind in Reaktion auf IL-8 zu migrieren. Bei Wiederholungen dieses Versuches war dieser Befund jedoch nicht immer reproduzierbar. Vor allem war die Chemotaxis nicht eindeutig nachweisbar, wenn die Negativkontrollen sehr hoch waren. Zusätzlich wurde ein Agarospotassay durchgeführt, um qualitativ die Chemotaxis der CXCR1-transfizierten HEK293 zu bestätigen. Dieser Assay zeigte eine Migration der Zellen in den mit IL-8 versehenen Agarospot und keine Migration in den PBS enthaltenden Spot. Dieses Ergebnis spiegelte die des Transwellassays wieder und belegte die Chemotaxis der Zellen in einem anderen Migrationssystem. Die Ergebnisse der HEK293-CXCR1-Zellen im Transwellassay deckten sich mit denen, der HEK293-CXCR1/EGFP-Zellen. Beide Zelllinien waren auf unterschiedliche Weise in verschiedenen Laboren<sup>a</sup> transfiziert worden, aber die Ergebnisse waren vergleichbar. Somit wurde die eingeschränkte Verwendbarkeit dieser Zellen im Transwellassay bestätigt.

Die Auswertung des Transwellassays könnte eventuell durch Trypsinieren der Zellen auf, in und unter der Membran erfolgen. Dadurch könnten sich die Zellen von der Membran ablösen und die

<sup>a</sup> Dipl.-Chem. Marina Jöst, Darmstadt; Jean-Luc Galzi, Ph.D., Straßburg

---

Zellen unterhalb der Membran könnten in Lösung gebracht werden. Somit könnte die Zelldichtebestimmung ausschließlich mit diesen Zellen erfolgen und die Problematik der Unterscheidung von Zellen oberhalb und unterhalb der Membran wäre nicht mehr gegeben. In der Literatur werden häufig die Zellen im Filter nach entsprechender Migrationszeit fixiert und nach Anfärben im Mikroskop ausgezählt.<sup>[226,266,267]</sup> Diese Methode wurde ebenfalls in dieser Arbeit getestet, jedoch erwies sie sich als nicht praktikabel. Da sich die Zellen nicht nur an der Unterseite der Membran, sondern auch in der Membran befanden, konnte keine klare Zellebene bestimmt und somit eindeutige Zellzahlen erhalten werden. Mit einem Konfokalmikroskop könnte dieses Problem behoben werden, es stand jedoch keines im Arbeitskreis zur Verfügung.

Obwohl die Transfektion von GPCRs in HEK293-Zellen ein Standardverfahren zur Bereitstellung chemokinresponsiver Zellen für Migrations- und Aktivitätsassays darstellt<sup>[249,268,269,270]</sup>, ist die chemotaktische Antwort auf IL-8 gering. Weiterhin ist die Migrationsgeschwindigkeit der HEK293 sehr langsam, wodurch zeitaufgelöste Aufnahmen der Zellmigration sehr lange dauern und die Zellen in der Zeit ihre Vitalität verlieren können, da unter dem Mikroskop nicht ihre optimalen Kulturbedingungen herrschen. Bei der Verwendung einer begasbaren Inkubationskammer könnten diese Bedingungen geschaffen werden. Durch die Verwendung von Neutrophilen können dagegen aufgrund ihrer hohen Migrationsgeschwindigkeiten deutlich mehr Informationen erhalten werden. HEK293-CXCR1-Zellen kommen demnach nicht als Ersatz zu neutrophilen Granulozyten in Frage.

Neben den mit CXCR1 transfizierten Epithelzellen HEK293 wurden auch zwei Endothelzelltypen (HUVEC und ECFC) auf ihre chemotaktische Aktivität in Antwort auf IL-8 getestet. Endothelzellen sind vor allem aufgrund ihrer angiogenetischen Wirkung befähigt, nach Chemokinen zu migrieren. Die Expression der beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 auf HUVECs sowie ihre Fähigkeit nach IL-8 zu migrieren, ist seit Jahren in der Literatur kontrovers, wobei häufiger eine nicht chemotaktische Wirkung von IL-8 auf diese Zellen beschrieben wird.<sup>[152,155,157,159]</sup> Mit den optimierten Parametern des Transwellassays konnte für diesen Zelltyp keine Chemotaxis beobachtet werden, was die erwähnten Literaturberichte bestätigt. Die *endothelial colony-forming cells* (ECFC) sind Vorläuferzellen, die sich zu spezifischen Endothelzellen differenzieren können.<sup>[211]</sup> Daher lag die Vermutung nahe, dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen, Chemotaxis nach IL-8 zu zeigen, auch wenn keine Literatur dies bisher beschreibt. Jedoch konnte auch hier keine Chemotaxis in den Transwellexperimenten beobachtet werden. Als IL-8 responsive Endothelzellen werden in der Literatur vor allem *human microvascular endothelial cells* (HMEC) und *human intestinal microvascular endothelial cells* (HIMEC) beschrieben.<sup>[155,157,271,272]</sup> Diese Zellen exprimieren wie Neutrophile sowohl den CXCR1 als auch den CXCR2 Rezeptor, obwohl die Signaltransduktion nicht analog zu Neutrophilen verläuft.<sup>[272,273]</sup> In der Literatur wird von einer starken Chemotaxis dieser Zellen in Antwort auf IL-8 berichtet. In zukünftigen Arbeiten könnte dies getestet werden, um die neutrophilen Granulozyten langfristig zu ersetzen.

---

## 6.2 Assays zur Charakterisierung von und *High-Throughput Screening* nach Chemokinininhibitoren

---

---

### 6.2.1 Charakterisierung der chemotaktischen Aktivität eines IL-8 Inhibitorpeptids im Transwellassay und im klassischen Aktinpolymerisationsassay

---

Das von Helmer *et al.* entwickelte Inhibitorpeptid IL8RPLoops für IL-8<sup>[230]</sup>, abgeleitet aus dem G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR1, sollte auf seine inhibitorische Wirkung auf neutrophile Granulozyten *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden die in dieser Arbeit etablierten, zellbasierten Assays für Migration und Aktinpolymerisation verwendet.

Zur Untersuchung der Inhibition der IL-8 vermittelten Chemotaxis wurde ein Transwellassay mit neutrophilen Granulozyten durchgeführt, dessen Anwendung in diesem Gebiet weit verbreitet ist, da er eine schnelle Durchführung und Auswertung gewährleistet.<sup>[274,275,276,277]</sup> Die Zellzahlbestimmung mit Neutrophilen im Transwellassay erfolgte bislang mit Calcein-AM Färbung, jedoch war der Inhibitor IL8RPLoops mit Fluorescein konjugiert und beide Substanzen fluoreszieren bei der gleichen Wellenlänge im grünen Kanal. Aus diesem Grund wurden die migrierten Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Neben der Positiv- und Negativkontrolle wurde ebenfalls eine Antikörperkontrolle mitgeführt, um die beobachtete Migration spezifisch auf IL-8 zurückführen zu können und einen Vergleich zum Inhibitor IL8RPLoops zu haben. Zusätzlich wurde ein weiterer chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten, *N*-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin (fMLP), hinzugenommen, der ebenfalls in der Literatur als Chemoattraktant für Neutrophile beschrieben wird.<sup>[274,278]</sup> Durch die Kontrolle mit fMLP und IL8RPLoops konnte die inhibitorische Wirkung des Peptids auf seine spezifische Bindung an IL-8 zurückgeführt werden. Bereits eine Konzentration von 0,5  $\mu$ M des Peptids entsprechend der  $K_D$  verringerte die Migration deutlich und die 5fache  $K_D$ -Konzentration konnte den chemotaktischen Effekt von IL-8 auf ca. ein Drittel vermindern (Abbildung 5.18). Problematisch war jedoch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, was aber nicht an dem Inhibitorpeptid selbst, sondern an dem Transwellassay lag. Die inhibitorische Wirkung des von Helmer *et al.* entwickelten Peptids IL8RPLoops auf die chemotaktische Aktivität von IL-8 wurde dennoch eindeutig nachgewiesen.

Die Verwendung eines 24-Well-Systems zeigte dabei im Vergleich zum 96-Well-System besser reproduzierbare Ergebnisse. Daher sollte dieses System für alle weiteren Versuche vorgezogen werden. Es ist aber aus Kostengründen nicht zum Screenen von Inhibitoren geeignet, sondern sollte nur zur finalen Charakterisierung vielversprechender Inhibitoren verwendet werden.

Auffällig waren die großen Schwankungen der Positivkontrollen von IL-8 und fMLP mit 10 bis 30 % Zellmigration. Im Transwellassay zum Test der chemotaktischen Aktivität von IL-8 und verschiedenen Derivaten (Kapitel 5.1.1) lag die Zellzahl an nach IL-8 migrierten Zellen zwischen 50 und 60 % und somit deutlich über den in diesem Kapitel beobachteten. Dies verdeutlicht erneut die Schwierigkeiten in der Handhabung von neutrophilen Granulozyten. Die Sensitivität und die schnelle Aktivierung der Zellen durch mechanische Belastung beim Pipettieren sowie der gesundheitliche Zustand des Donors können für diese Ergebnisse verantwortlich sein.<sup>[255,279]</sup>

---

Im nächsten Schritt sollte die Wirkung des Inhibitorpeptids auf Ebene der Aktinpolymerisation nachgewiesen werden. Ein kurzzeitiger Anstieg der Aktinpolymerisation innerhalb von Sekunden nach Aktivierung mit dem entsprechenden Chemoattraktanten ist charakteristisch und wird in der Literatur für IL-8 beschrieben.<sup>[280,281,282,283]</sup> Dieser Effekt von IL-8 auf neutrophile Granulozyten konnte nachgewiesen werden, jedoch zeigte auch die Stimulierung mit Medium ohne Chemoattraktant einen vergleichbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit der Aktinpolymerisation, der nicht zu erwarten gewesen wäre. Auch in der Literatur wurde ein solcher Effekt nicht beobachtet.<sup>[281,282,283]</sup> Der Test mit dem anti-IL-8 Antikörper und dem IL8RPLoops konnte keine große Veränderung im Anstieg des F-Aktins zeigen und somit war der beobachtete Effekt nicht auf IL-8 zurückzuführen. Der Grund hierfür lag vermutlich wie bereits bei den Transwellassays in der schwierigen Handhabung der neutrophilen Granulozyten. Primäre, frisch isolierte Neutrophile sind sehr temperatursensitiv und zeigen auch keine lange Lebensdauer bzw. Aktivität nach Isolierung. Somit konnte der klassische Aktinpolymerisationsassay nicht für die Untersuchung von Inhibitoren verwendet werden und auch der Transwellassay eignet sich nur zur Charakterisierung einzelner potentieller Inhibitoren.

---

### 6.2.2 NMR-Bindungsstudien mit IL8RPLoops

---

Zur Bestätigung der von Helmer *et al.* vorgeschlagenen Bindungsregionen des IL8RPLoops<sup>[230]</sup> an IL-8 sollten NMR-Studien mit <sup>15</sup>N-markiertem IL-8 und dem Inhibitorpeptid durchgeführt werden. Das HSQC-Spektrum des reinen IL-8 stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen überein, wodurch die Struktur des rekombinant hergestellten IL-8 bestätigt wurde.<sup>[234]</sup> Bei der Überlagerung eines HSQC-Spektrums des reinen IL-8 und einer Mischung von IL-8 mit IL8RPLoops konnten keine Unterschiede in den Verschiebungen detektiert werden. Die Bindung zwischen IL-8 und IL8RPLoops kam vermutlich nicht zustande, da bereits bei dem Versuch zu beobachten war, dass die hoch konzentrierte Peptidlösung bei der Zugabe zur Proteindlösung ausfiel. Somit war die Versuchsdurchführung limitiert und bei weiteren Versuchen sollte nach einem Zusatz gesucht werden, der die Löslichkeit des Peptids erhöht, ohne die Bindung oder die NMR-Messung zu beeinflussen. Es könnte alternativ auch bei niedrigeren Konzentrationen gemessen werden, wobei darauf geachtet werden muss, dass die eingesetzte Konzentration nicht unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

---

### 6.2.3 Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen

---

Ein Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen zum *High-Throughput Screening* von Inhibitoren sollte entwickelt werden, um viele potentielle Inhibitoren parallel testen zu können. Durch *Mix-and-Split*-Synthese werden kombinatorische Bibliotheken mit einer großen Anzahl potentieller Inhibitoren erhalten, die in einem ersten, einfachen Versuch auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht werden sollen, sodass aus vielen potentiellen Inhibitoren tatsächliche Inhibitoren identifiziert werden können. Ein HTS-Format für die Chemotaxis lieferte keiner der in Kapitel 5.2 verwendeten Assays, da sie sich als nicht besonders robust und schlecht reproduzierbar herausgestellt hatten. Die Vorstufe der Chemotaxis, die Aktinpolymerisation, kann als Maß der Chemotaxis verwendet werden. Ein Aktinpolymerisationsassay zum Test von Inhibitoren ließe Rückschlüsse einer inhibitorischen Wirkung auf die

---

Chemotaxis zu. Der klassische Aktinpolymerisationsassay ist wegen Fixierung und vieler Waschschr-  
te der Zellen aufwendig in der Durchführung und lässt von der Handhabung her keine Parallelansätze  
zu. Es sollte eine Weiterentwicklung dieses Assays realisiert werden, indem der komplette Assay in  
lebenden Zellen durchgeführt wird und somit die Fixierung und der aufwändige Versuchsaufbau weg-  
fallen. Der gewählte Ansatz bestand darin, das nicht zellgängige Phalloidin, das zum Nachweis der  
Aktinpolymerisation verwendet wurde, in die Zelle zu bringen, ohne die Zelle dabei zu schädigen. Es  
sollte eine Strategie verfolgt werden, in der die Membran mithilfe eines Permeabilisierungsreagenz re-  
versibel permeabilisiert wird. Dazu wurde Saponin verwendet<sup>[247]</sup>, dessen Wirkung durch die Zugabe  
von ATP unterstützt werden sollte.<sup>[244]</sup> Durch die Verwendung eines hypotonischen Puffers entsteht  
ein osmotischer Druck auf die Zelle, der zum Einstromen der äußeren Lösung und darin befindlichen  
Substanzen in die Zelle führt.<sup>[247]</sup>

Die Permeabilisierung der Membran mit Saponin zur Einbringung von Substanzen findet seit Jahren  
Anwendung<sup>[243,244,245,246,247]</sup> und konnte erfolgreich dazu verwendet werden, Phalloidin in lebende  
Zellen zu bringen. Es stellte sich heraus, dass eine Konzentration größer  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin in Ver-  
bindung mit einer Inkubationszeit länger als 10 min toxisch für die Zellen war. Daher wurde zunächst  
eine Konzentration von  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  Saponin mit einer Inkubationszeit von 10 min verwendet. Der an-  
fängliche Ansatz, in dem erst Phalloidin mit mithilfe des Saponins in die Zelle gebracht wurde, um  
dann eine Aktivierung mit IL-8 durchzuführen, erwies sich als nicht zielführend. Phalloidin bindet  
F-Aktin und verschiebt das Aktinpolymerisationsgleichgewicht zur Seite des F-Aktins und verhindert  
die Depolymerisation.<sup>[161]</sup> Dieser Vorgang scheint relativ schnell von statten zu gehen, da eine an-  
schließende IL-8 Aktivierung keinen nachweisbaren Anstieg des F-Aktins in den Zellen hervorrief,  
stattdessen blieb die Fluoreszenzintensität konstant. Die simultane Zugabe von Phalloidin und IL-8  
parallel zur Permeabilisierung resultierte in vergleichbaren Ergebnissen, wobei weniger Phalloidin in  
die Zellen aufgenommen wurde. Auch diese Strategie schien somit nicht sinnvoll. Die drei Schritte  
Permeabilisierung der Membran, Phalloidineinstrom in die Zelle und Aktivierung mit IL-8 mussten  
teilweise voneinander getrennt werden. Dabei sollten aber IL-8 und Phalloidin gleichzeitig auf die  
Zelle wirken, um den Einfluss des IL-8 auf die Aktinpolymerisation nachweisen zu können. Somit  
ergab sich der neue Versuchsaufbau, bei dem zuerst die Membran für 10 min permeabilisiert wurde  
und anschließend Phalloidin und IL-8 hinzugegeben wurden. In diesem Fall wurde die Saponinlö-  
sung während der Messung nur verdünnt und nicht komplett entfernt, wodurch über die komplette  
Messzeit hinweg Phalloidin aus der Lösung in die Zelle einströmen konnte. Durch Zugabe der Aktivie-  
rungslösung in 3:2-Puffer wurde weiterhin eine hypotonische Umgebung der Zelle aufrecht erhalten,  
wodurch der osmotische Druck über die gesamte Messzeit den Einstrom der äußeren Lösung in die  
Zelle gewährleistete. Mit diesem experimentellen Setup wurden signifikante Unterschiede zwischen  
mit IL-8 aktivierten und nicht aktivierten Zellen gemessen. Es wurde auch bei permeabilisierten, nicht  
mit IL-8 aktivierten Zellen ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit beobachtet, der durch die  
Phalloidin induzierte Aktinpolymerisation begründet werden kann. Das IL-8 induzierte Signal konn-  
te durch die Inhibition mit einem anti-IL-8 Antikörper unterdrückt werden, wodurch nachgewiesen  
wurde, dass der beobachtete, zusätzliche Anstieg gegenüber der Negativkontrolle ohne IL-8 spezifisch  
auf IL-8 zurückzuführen war. Auch konnte die unterstützende Funktion des ATPs bei der Permeabi-  
lisierung, wie von Johnson *et al.*<sup>[244]</sup> beschrieben, bestätigt werden. Ein signifikanter Anstieg der

---

Fluoreszenzintensität nach Zugabe von IL-8 war ausschließlich für Saponin/ATP nicht aber für reines Saponin zu beobachten. Die unspezifische Wechselwirkung, die Phalloidin mit der Membran der Zellen einzugehen scheint, könnte durch die Zugabe von BSA in den Puffer unterdrückt werden. Der Hintergrund der Messung könnte damit erniedrigt und somit das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis verstärkt werden.

Der  $Z'$ -Faktor ist eine dimensionslose Kennzahl, die zur Evaluation der Eignung eines Assays im HTS-Format herangezogen werden kann.<sup>[250]</sup> Trotz einer Zweifachbestimmung, die aus Kostengründen gewählt wurde, konnten nach einer Messzeit von einer Stunde Werte von über 0,5 erhalten werden, die die Eignung des Aktinpolymerisationsassays in lebenden Zellen für das HTS-Format belegten. Eine anschließende Überprüfung der Viabilität der Zellen zeigte, dass die Zellen während der 60-minütigen Messzeit nahezu vollständig abgestorben waren. Verschiedene Versuche, ein signifikantes IL-8 induziertes Signal ohne Zellsterben zu erhalten, schlugen fehl. Die Saponinkonzentration über die lange Messzeit und der Einstrom des umgebenen Mediums in die Zellen führten zum Zelltod. Jedoch waren genau diese Parameter notwendig, damit ein signifikantes IL-8 Signal erhalten werden konnte. Für die Auswertung des Assays ist es andererseits nicht notwendig, dass die Zellen am Ende noch vital sind, da es ausreicht, ein spezifisches IL-8 induziertes Signal im Vergleich zu permeabilisierten Zellen ohne IL-8 Aktivierung und dessen Inhibierung messen zu können. Diese Erwartungen konnten erfüllt werden. Die Zellen sind zu Beginn des Versuchs unter den gewählten Bedingungen vital, sodass eine IL-8 verstärkte Aktinpolymerisation ausgelöst werden kann. Die lange Messzeit ist notwendig, um einen möglichst großen Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrolle und somit signifikante Unterschiede zu erhalten. Es wären an dieser Stelle abschließende Versuche zur  $Z'$ -Faktorbestimmung aus mehreren parallelen Ansätzen durchzuführen, um die Eignung dieses Assays für HTS endgültig zu belegen. Damit könnte eventuell auch eine Verkürzung der Messzeit einhergehen, da der  $Z'$ -Faktor bereits nach ca. 30 min Messzeit einen Wert um 0,5 annahm. Auch sind parallele Ansätze mit vielen Inhibitoren neben dem anti-IL-8 Antikörper durchzuführen, um zu zeigen, dass dieser Assay für das Screenen von Inhibitoren geeignet ist. Diese Versuche werden aktuell im Rahmen der Master-Thesis von Victoria Engemann durchgeführt. Prinzipiell kann festgehalten werden, dass der Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen sehr einfach in der Durchführung ist, da nacheinander lediglich zwei Lösungen in eine Mikrotiterplatte mit Zellen gegeben werden und anschließend in einem Mikrotiterplattenlesegerät die Fluoreszenzintensitäten von unten detektiert wird. Es gibt bisher keine Literatur, die einen vergleichbaren Assay zur Untersuchung der Aktinpolymerisation in lebenden Zellen im HTS-Format beschreibt. Daher wird die Aktinpolymerisation bislang auch noch nicht für diese Anwendung genutzt. Durch seine Einfachheit, nicht nur in der Durchführung, sondern auch in der Auswertung und Quantifizierung, bietet der in dieser Arbeit entwickelte Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen eine sehr gute Alternative zum Test von Inhibitoren auf migratorisches Verhalten.

Um die Viabilität der Zellen während des Versuchs aufrecht zu erhalten, könnten zusätzlich alternative Strategien getestet werden. So könnte das Permeabilisierungsreagenz ausgetauscht werden. Lysolecithin ist ein schwaches Permeabilisierungsreagenz, das bei niedrigen Konzentrationen die Zellpermeabilität für kleine Moleküle erhöht, wobei die Zellviabilität erhalten bleibt.<sup>[284]</sup> Streptolysin-O ist ein weiterer Vertreter, der zur reversiblen Permeabilisierung von Zellmembranen und dem Ein-

---

bringen von Substanzen bis 100 kDa verwendet werden kann.<sup>[285]</sup> Alternativ könnte jedoch auch ein chemisch modifiziertes Phalloidin verwendet werden, das ohne Einfluss auf die Zellmembran oder die Zelle in diese gelangen kann. Nitrobenzoxadiazol-Phalloidin (NBD-Phalloidin) kann, vermutlich durch Pinozytose, von Zellen aufgenommen werden. Dabei sind kleine, intrazelluläre Konzentrationen von 5 - 15 nM Phalloidin realisierbar<sup>[240]</sup>, was den Konzentrationen von 6 nM Phalloidin in dem hier entwickelten Assay entspricht. Anderl *et al.* beschreiben eine Reihe von Phalloidinderivaten, die mit internalisierungsvermittelnden Resten konjugiert sind, durch die das Phalloidin durch Endozytose in die Zelle gelangen und weiterhin, wenn auch teilweise mit niedrigerer Affinität, an F-Aktin binden kann.<sup>[241]</sup> Auch diese könnten in dem Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen in zukünftigen Arbeiten getestet werden.

Zusammengefasst ergeben die Versuche, dass HEK293-CXCR1-Zellen als Antwort auf IL-8 nur schwach migrieren, jedoch einen deutlichen Anstieg der Aktinpolymerisation zeigen. Dies entspricht Berichten aus der Literatur. Biber *et al.* zeigten an L-CCR (*orphan mouse chemokine receptor*) transfizierten HEK293 nach 10-minütiger Stimulierung mit 10 nM CCL2 und anschließender Fixierung und Phalloidinfärbung eine eindeutige Aktinpolymerisation, die auch nach 1 h noch messbar war.<sup>[248]</sup> Es erfolgte jedoch weder eine Quantifizierung noch ein Vergleich mit nicht stimulierten Zellen. Auch Dagan-Berger *et al.* zeigten Aktinpolymerisation in mit CXCR3 transfizierten HEK293, die mit CXCL11 ebenfalls für 10 min aktiviert und anschließend fixiert wurden.<sup>[249]</sup> Somit sind die mit GPCRs transfizierten HEK293-Zellen generell in der Lage, auf Aktivierung mit dem korrespondierenden Chemokin mit Aktinpolymerisation zu reagieren, die mit Phalloidinfärbung nachgewiesen werden kann. Die Eignung dieser Zellen im Aktinpolymerisationsassay war somit deutlich besser als die für den Migrationsassay im Transwellssystem. Für die Chemotaxis sind demnach neutrophile Granulozyten besser geeignet, aber die transfizierten HEK293-Zellen können als Ersatz in Aktivitätsassays auf Ebene der Aktinpolymerisation dienen.

Da Chemokine jedoch *in vivo* primär auf Immunzellen wirken und diese *per se* Chemokinrezeptoren exprimieren, wäre eine Übertragung dieses Assays auf diese Zellen von großem Interesse, um auch weitere Chemokine und deren Inhibitoren testen zu können. Erste Versuche zeigten, dass Saponin eine sehr unterschiedliche Wirkung auf neutrophile Granulozyten und die Monozytenzelllinie THP-1 hat. Zur Verwendung der Zellen in diesem Assay muss zunächst eine Anpassung der Parameter erfolgen. Auch ist die Aktinpolymerisation in diesen Zellen deutlich schneller und weist innerhalb der ersten Minute ein charakteristisches Maximum auf, weshalb Phalloidin bereits gleich zu Beginn in der Zelle vorliegen sollte. Aus diesen Gründen sollte für Immunzellen eine andere Strategie gewählt werden. Einerseits könnten alternative Permeabilisierungsreagenzien getestet werden, die besser auf diese Zellen wirken. Außerdem könnte auch ein chemisch modifiziertes Phalloidin verwendet werden, das membrangängig ist, sodass es keiner weiteren Permeabilisierung bedarf.

Der in dieser Arbeit entwickelte Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen stellt eine neue, einfache und kostengünstige Variante zum Screenen von Inhibitoren auf das migratorische Verhalten von Zellen dar. Nach den abschließenden Versuchen im Rahmen der Master-Thesis von Victoria Engemann soll dieser Assay publiziert werden.



---

## 6.3 Chemotaxis an Einzelzellen

---

### 6.3.1 Mikrofluidische Kanäle zur Untersuchung von Chemotaxis

---

Die Etablierung der Methode der Mikrofluidik war ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit und sollte Untersuchungen der Chemotaxis von Zellen dienen. Die benötigten Mikrokanäle wurden von Dr. Suman Narayan und Asma Siddique, M.Phil. (AK Prof. Dr. Stark, TU Darmstadt) erhalten und auf ihre Tauglichkeit für IL-8 Gradienten getestet. Zunächst wurde festgestellt, dass die aus PDMS bestehenden Kanäle mit Kollagen beschichtet werden müssen, damit die hydrophobe Oberfläche des PDMS nicht den laminaren Fluss in den Kanälen behindert. Anfangs wurden Kanäle mit einem Durchmesser von  $100\mu\text{m}$  und einer Länge von 1 cm verwendet. Versuche mit 30 und 60 min Flusszeit zeigten, dass die Bildung eines IL-8 Gradienten in diesen Kanälen möglich ist. Dabei nahm entsprechend der Erwartungen die Steigung des Gradienten in y-Richtung mit der Länge des Kanals ab, erreichte jedoch keinen völligen Ausgleich der beiden Lösungen am Ende des Kanals. Beim Vergleich der beiden Flusszeiten wurde festgestellt, dass nach 30 min kein Verteilungsgleichgewicht eingestellt war, da sich die Fluoreszenzintensitätsprofile unterschieden. Für Zellexperimente sollte der stationäre Zustand des Gradienten jedoch gegeben sein. Dazu sollten weitere Versuche mit Messungen zu mehreren Zeitpunkten erfolgen, um die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts bestimmen zu können und einen stationären Zustand für Zellversuche sicherzustellen.

Für Zellexperimente waren die Dimensionen des verwendeten Kanals ungeeignet, da nur eine Migrationsdistanz von maximal  $100\mu\text{m}$  vorhanden war. Aus diesem Grund wurden neue Kanäle mit größeren Dimensionen,  $498\mu\text{m}$  Durchmesser und 2 cm Kanallänge, und einem weiteren Eingang für Zellen hergestellt. Nachdem sichergestellt worden war, dass auch mit diesem Kanal IL-8 Gradienten in y-Richtung hergestellt werden konnten, wurde im nächsten Schritt der Einfluss eines zusätzlichen Flusses über den mittleren Eingangs auf die Gradientenbildung getestet. Dabei wurden durch den Fluss im mittleren Kanal die Steigungen der jeweiligen Gradienten in y-Richtung im Vergleich zu keiner Verwendung des mittleren Kanals deutlich herabgesetzt, wobei eine Variation der angelegten Flussrate ( $0,05$ ,  $0,1$  und  $0,2\mu\text{L min}^{-1}$ ) keinen großen Unterschied in den Steigungen aufwies. Neben der Steigung ist auch die Ausdehnung des linearen Bereichs im Konzentrationsgradienten wichtig. Dieser sollte möglichst mind. 70 bis 80 % der Gesamtdistanz ausmachen. Die Betrachtung der Anteile an linearen Bereichen zeigte, dass eine Flussrate von mindestens  $0,1\mu\text{L min}^{-1}$  im mittleren Kanal verwendet werden sollte, da sonst die Ausdehnung des linearen Bereichs unter 50 % liegt.

In Mikrokanälen ist die Diffusion der dominierende Prozess, da die Advektion klein ist.<sup>[180,182]</sup> Das Verhältnis von Durchmesser zur Länge des Kanals ist dabei entscheidend für die Diffusion. So konnte bei den ersten Kanälen von  $100\mu\text{m}$  Durchmesser nach einer Distanz von 1 cm ein zu fast 100 % linearer Bereich erhalten werden. Bei der Vergrößerung des Durchmessers auf fast das Fünffache auf  $498\mu\text{m}$  wurde die Kanallänge jedoch nur verdoppelt und es blieb bei den gewählten Flussraten nicht genügend Zeit, um mehr Vermischung der beiden Flüssigkeiten durch Diffusion zu realisieren. Um der Diffusion mehr Zeit zu geben, muss somit die Verweilzeit der beiden Lösungen im Kanal erhöht werden. Die Verweilzeit ist in einem Kanal mit einem runden Querschnitt (näherungsweise durch den Kanal realisiert) proportional zum Quadrat des Radius, zur Länge des Kanals und dem Kehrwert des

---

Volumenstroms, sprich zur Flussrate.<sup>[286]</sup> Somit kann die Verweilzeit durch Vergrößerung des Radius erhöht werden. In dem Fall hätte die Diffusion jedoch über eine noch größere Distanz zu wirken, so dass dieser Ansatz nicht zu dem gewünschten Ziel führt. Auch könnte die Länge des Kanals vergrößert werden, dafür würden jedoch neue Kanäle mit anderen Dimensionen gebraucht, die zunächst hergestellt werden müssten. Somit ist die dritte Möglichkeit, die Flussrate herabzusetzen, der zunächst beste Ansatz, um die Verweilzeit der Lösungen im Kanal zu erhöhen und somit die Ausbildung des Gradienten durch Diffusion zu verbessern.

In weiterführenden Arbeiten sollten noch weitere Parameter getestet werden. Zum einen sollte mit den neuen Kanälen die Einstellung des Gleichgewichts durch die Beobachtung der Gradientenbildung in y-Richtung über der Zeit untersucht werden, um einen Zeitpunkt festzulegen, an dem ein stationärer Zustand im Kanal herrscht. Zum anderen sollten die Flussraten der beiden äußeren Eingänge verringert werden, um die Verweilzeit der Lösungen im Kanal zu erhöhen und somit die Ausbildung des Gradienten durch Diffusion zu verbessern. Auch könnte eine größere Flussrate von z.B.  $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$  im mittleren Eingang auf seinen Einfluss auf den Gradienten und die Länge des linearen Bereichs getestet werden. Nachdem diese Parameter optimiert und ein stationärer Zustand im System erreicht wäre, wäre der letzte Schritt vor den Migrationsversuchen mit Zellen die Anpassung des Konzentrationsbereichs der Gradienten für die Zellen. Jeon *et al.* testeten verschiedene Interleukin-8 Konzentrationen zwischen 0 und 5, 50 oder 500 ng/mL über einen Kanaldurchmesser von  $500 \mu\text{m}$  und fanden heraus, dass der lineare Gradient zwischen 0 und 50 ng/mL IL-8 den größten chemotaktischen Einfluss auf neutrophile Granulozyten hat.<sup>[176]</sup> Lin *et al.* zeigten ebenfalls einen optimalen Konzentrationsbereich zwischen 0 und 50 ng mL<sup>-1</sup> IL-8 jedoch in einem  $350 \mu\text{m}$  dicken Kanal, sodass die effektive Steigung größer war als bei Jeon *et al.*<sup>[123]</sup> Diese Bereiche liefern Ansatzpunkte dafür, welcher Konzentrationsbereich für die ersten Migrationsversuche mit Neutrophilen in einem IL-8 Gradienten realisiert werden sollte.

---

### 6.3.2 Haptotaxisassay für Leukozyten basierend auf oberflächengebundenen Chemokingradienten

---

Es wurde die Methode von Mayer *et al.*<sup>[202]</sup> zur Herstellung von Proteingradienten auf Oberflächen verwendet, um einen Haptotaxisassay für neutrophile Granulozyten zu entwickeln. Die Idee, eine 384-Well-Mikrotiterplatte als Gießform zu verwenden, stellte sich als praktikabel heraus. Die Herstellung der Stempel war damit sehr einfach und bei luftdichtem Verschließen der Mikrotiterplatte konnten die Stempel ohne Weiteres ein bis zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Zunächst wurden nach den von Mayer *et al.* beschriebenen Parametern BSA Gradienten auf Oberflächen erzeugt, um die Methode zu überprüfen, bevor sie auf das Zielprotein IL-8 übertragen wurde. Dabei wurde jedoch keine Aldehyd- sondern eine mit Hydroxy- und Carboxygruppen funktionalisierte Petrischalenoberfläche verwendet, sodass es zu keiner kovalenten Bindung des Proteins kommen sollte. Da BSA dafür bekannt ist, auf den meisten Oberflächen unspezifisch zu binden, sollte es demnach auch an der Petrischalenoberfläche binden. Sowohl die Erzeugung von Gradienten als auch die Immobilisierung des fluoreszenzmarkierten BSAs auf der Oberfläche wurden erfolgreich durchgeführt. Dabei wiesen die Gradienten nur eine geringe Steigung auf und nur die vierstündige Inkubationszeit

---

resultierte in einer signifikanten Änderung der Proteinbeladung pro mm. Mayer *et al.* nahmen eine Normierung der Fluoreszenzintensität bei der Auswertung ihrer BSA Gradienten zwischen 1 (höchste Fluoreszenzintensität) und 0 (kleinste Fluoreszenzintensität) vor und erhielten Fluoreszenzintensitätsänderungen von  $3 \cdot 10^{-4} \% \mu\text{m}^{-1}$ . In dieser Arbeit wurden Änderungen von  $8 \cdot 10^{-4} \% \mu\text{m}^{-1}$  für eine vierstündige Diffusionszeit erhalten und lagen somit in der gleichen Größenordnung. Die beschriebene Diffusionslänge war mit  $3500 \mu\text{m}$  mit der in dieser Arbeit verwendeten nahezu identisch. Diese Methode ist also dazu geeignet, Gradienten durch Diffusion in einem Agarosegel zu erzeugen und diese durch einen einfachen Stempelprozess auf eine Oberfläche zu transferieren.

Anschließend wurde die Methode auf IL-8 übertragen. Dabei wurden die Diffusionszeiten im Vergleich zu BSA deutlich verkürzt, da einerseits IL-8 nur ein Achtel der Masse von BSA besitzt und somit weniger Barrieren in dem Agarosegel vorfindet. Andererseits ist der Diffusionskoeffizient für IL-8 mit einem Wert von  $D = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [176] um eine Größenordnung größer als der von Mayer *et al.* beschriebene für TRITC-BSA ( $D = 2,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) [202], woraus eine schnellere Diffusion resultiert. Es wurden IL-8 Oberflächen mit relativ wenig Artefakten erzeugt, die einen sigmoidalen Verlauf des Gradienten aufwiesen. Artefakte auf der Stempelfläche können die Zellmigration und somit die statistischen Daten beeinflussen, da an diesen Stellen nicht der gewünschte Gradient vorhanden ist. Diese Stellen wirken wie ein Hindernis auf die migrierenden Zellen, um das sie herum wandern müssen, wodurch der SMI erhöht wird. Die Diffusionszeiten hatten keinen großen Einfluss auf den Verlauf oder die Steigung des Gradienten. Es wurde eine relativ große Steigung von  $23 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  IL-8 für 75 min Diffusion über eine Länge von  $500 \mu\text{m}$  erhalten. Eine modifizierte Methode lieferte eine nahezu konstante Konzentrationsänderung über die gesamte Stempelfläche, jedoch war die Steigung mit  $0,008 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  IL-8 sehr gering. Somit konnte der Gradient durch Veränderung des Diffusionsprozesses variiert werden. Es können jedoch keine beliebigen Gradienten erzeugt werden, wie es z.B. bei der Verwendung der Mikrofluidik der Fall ist, bei der sowohl der lineare Bereich als auch die Steigung des Gradienten sehr fein eingestellt werden können. [176,178,184] Die Verwendung von Mikrokanälen erfordert im Gegenzug spezielle Ausrüstung und viel Zeit in der Etablierung solcher Anwendungen, während die hier entwickelte Methode sehr einfach und schnell durchzuführen ist und auch keine spezielle Ausrüstung benötigt. Außerdem ist die Immobilisierung der durch Mikrofluidik erzeugten Gradienten nicht einfach (Kapitel 2.3). Im Vergleich zu klassischen Methoden wie der Boyden- [173], Zigmond- [94] oder Dunn-Kammer [175] werden jedoch definierte, immobilisierte Gradienten erhalten, die in ihrer Form reproduzierbar sind. Die zeitliche und örtliche Stabilität der gestempelten Gradienten ist nicht vollständig gewährleistet, da ein Teil des IL-8 während des dreistündigen Zellexperiments von der Oberfläche diffundiert, wodurch die Form des Gradienten jedoch kaum beeinflusst wird. Es ist anzunehmen, dass das diffundierte IL-8 einen zusätzlichen, löslichen Gradienten oberhalb der Oberfläche ausbildet und so die Chemotaxis verstärken kann. Diese Situation ist der *in vivo* sehr ähnlich, wo die Zellen sowohl einem immobilisierten als auch einem löslichen Chemokingradient ausgesetzt sind. [287,288]

Der Test der beiden IL-8 Gradienten verschiedener Formen auf das Verhalten neutrophiler Granulozyten zeigte die Notwendigkeit einer relativ steilen Steigung der IL-8 Oberflächenbeladung, da nur der Gradient nach Methode von Mayer *et al.* nach 75 min Diffusionszeit mit einer Steigung von  $23 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  zu einem veränderten Zellverhalten im Vergleich zur unbehandelten Petrischalen-

oberfläche oder einer gestempelten Agaroseschicht führte. Die Steigung von  $0,008 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  des flachen Gradienten der modifizierten Methode reichte dazu nicht aus. Es ist bekannt, dass die Neutrophilenmigration von der Steigung eines IL-8 Gradienten und der IL-8 Konzentration abhängig ist: Mit mikrofluidischen Kanälen führte ein Konzentrationsbereich von IL-8 zwischen 0 und 5 bis  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  über einen linearen Bereich von  $500 \mu\text{m}$  zu Chemotaxis von Neutrophilen.<sup>[176,256]</sup> Dabei entspricht ein Anstieg von 0 bis  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  über eine Länge von  $500 \mu\text{m}$  einer Steigung von  $100 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$ . Die mit dieser Methode erhaltene Steigung von  $23 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  entspricht somit nur einem Viertel der Steigung in den mikrofluidischen Kanälen, die Chemotaxis in Neutrophilen induzierte. Dennoch war die Steigung des gestempelten Gradienten mit  $23 \text{ ng mm}^{-2} \text{ mm}^{-1}$  ausreichend und es konnte Chemotaxis beobachtet werden, während der flache Gradient diese Wirkung nicht auf die Zellen hatte. Diese Immobilisierungsstrategie ahmt die *in vivo* Situation der Chemotaxis nach, in der das Chemokin über Glykosaminoglykane auf der Endothelzellschicht immobilisiert ist. Die Art der Immobilisierung des IL-8 stellt dabei einen kritischen Faktor dar, da einerseits die Aktivität erhalten bleiben und andererseits die Rezeptorbindungsstelle für die Zellen zugänglich sein sollte. Da sowohl die Zellaktivierung als auch die Migration beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass das Protein in einer aktiven Form auf der Oberfläche gebunden vorlag. Es war vermutlich in die Agarose eingebettet, da der Transfer auf die Oberfläche nur mit Agarose zusammen stattfand, und da IL-8 keine direkte Wechselwirkung mit der Petrischalenoberfläche einging, konnte es seine native Faltung oder zumindest eine aktive Form beibehalten. Eine spezifische Wechselwirkung von IL-8 mit der Agarose aufgrund der Zuckerstruktur wie Glykosaminoglykane kann nahezu ausgeschlossen werden. Agarose besteht aus anderen Monomeren, die weiterhin nicht sulfatiert sind und somit auch keine negativen Ladungen aufweisen. Auch spricht der von der Oberfläche diffundierte Teil an IL-8 während des dreistündigen Zellexperiments gegen eine spezifische Bindung von IL-8 an Agarose und es liegt vermutlich eine Einbettung der IL-8 Moleküle in dem Agarosenetzwerk vor. Um diese Hypothese zu belegen, sollten Bindungsstudien mit IL-8 und Agarose durchgeführt werden, die eine spezifische Bindung ausschließen.

Der Anteil an migrierenden Zellen lag nur zwischen 30 und 50 % der gesamten adhären Zellen auf der Oberfläche, während die restlichen Zellen lebend, jedoch unpolarisiert auf der Oberfläche verblieben. Diese Zellen wurden zwar durch IL-8 aktiviert, sichtbar anhand der gebildeten Lamellipodien, jedoch verblieben sie in ihrer sphärischen Gestalt und bewegten sich nicht. In den in dieser Arbeit durchgeführten Transwellassays konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Die Anzahl an migrierenden Zellen lag in der Positivkontrolle dabei zwischen 15 und 70 % der absoluten Zellzahl und ein Teil der Zellen migrierte demnach nicht. In dem ersten berichteten Chemotaxisexperiment mit IL-8 in einem Multiwell-Kammerassay machten Yoshimura *et al.* bereits ähnliche Beobachtungen.<sup>[38]</sup> Bei einer optimalen IL-8 Konzentration von  $10 \text{ nM}$  migrierten dort nur 54 % der Zellen. Keenan *et al.* berichtete ebenfalls, dass 38 % der adhären Zellen auf einer Petrischalenoberfläche keine Migration zeigten, jedoch aber die Bildung von Lamellipodien.<sup>[289]</sup> Die Oberfläche scheint die Migration der Zellen zum Teil zu verhindern, indem starke Wechselwirkungen zwischen der Zelle und der Oberfläche ausgebildet werden. Dies kann zum Teil auch im Transwellassays eine signifikante Anzahl an nicht migrierenden Zellen ausmachen, da die Membran ebenfalls eine Oberfläche zur Adhäsion darstellt. Weitere Faktoren für die Schwankungen liegen vermutlich in der Sensitivität

---

und der schnellen Aktivierung der Zellen sowie dem physischen Zustand des Donors.<sup>[255,279]</sup> Auch spielen *in vivo* eine Reihe von Adhäsionsproteinen bei der Leukozytenmigration eine wichtige Rolle.<sup>[290,291]</sup> So hängt die Zellmigration sehr von den Integrin-Ligand-Wechselwirkungen und somit von dem Liganden- und Integrinlevel sowie deren Bindungsaffinitäten ab.<sup>[292]</sup> Durch die zusätzliche Immobilisierung von Adhäsionsliganden auf den Oberflächen des Haptotaxisassays könnten mehr Zellen dazu befähigt werden, zu migrieren und sollte Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

Für die statistische Analyse der Haptotaxisexperimente wurden Migrationstrajektorien erstellt. Weiterhin musste ein geeigneter Chemotaxisindex zur Bewertung der Ergebnisse gefunden werden. Es wurde gezeigt, dass die Verwendung der üblichen Indices wie dem Kosinus des Winkels  $\theta$ , der *Geradlinigkeit* oder dem *FMI* keine quantitative Informationen über die Präzision der Migration entlang des Gradienten liefern, da sie nicht alle notwendigen Informationen berücksichtigen. Daher wurde ein alternativer Index, der *Chemotactic Precision Index (CPI)*, für die quantitative Evaluierung der Migration entwickelt. Dieser Index berücksichtigt den Winkel  $\phi$  zwischen dem Richtungsvektor des Gradienten und der direkten Verbindungslinie zwischen Anfangs- und Endpunkt der mittleren Migrationstrajektorie aller Zellen, die Migration entlang des Gradienten (*FMI*) und die Migration senkrecht zum Gradienten (*SMI*). Letztere sollte bei präziser Migration möglichst klein sein und daher wird der Betrag von  $1-SMI$  verwendet. Die Auswertung der drei Haptotaxisexperimente lieferte Werte  $\geq 0,6$  und zeigte somit eine sehr präzise Migration der Zellen entlang des gegebenen IL-8 Gradienten an. Um den *CPI* auch zum Vergleich verschiedener Oberflächen auf das haptotaktische Verhalten von Zellen verwenden zu können, sollten möglichst wenig Abweichungen innerhalb einer Oberflächenbeladung vorhanden sein. Werte zwischen 0,6 und 0,7 zeigen zwar einen Unterschied, aufgrund der mehrfach diskutierten Schwierigkeiten mit Neutrophilen und den Artefakten auf den Proteinoberflächen sind diese Unterschiede jedoch gering und es sollte möglich sein, Unterschiede im Zellverhalten zu anderen Beschichtungen auf Oberflächen aufzuzeigen. Weiterhin kann zu jeder zu testenden Oberfläche ebenfalls ein Referenzgradient mitgeführt werden, um einen direkten Vergleich bei den gleichen Bedingungen ziehen zu können.

Der *CPI* weist einige Vorteile gegenüber den anderen Chemotaxisindices auf. Der Index ist, basierend auf den etablierten Indices *Geradlinigkeit*, *FMI* und *SMI*, sehr einfach zu berechnen. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und erlaubt somit eine intuitive Bewertung der Präzision, mit welcher die Zellen einem gegebenen Gradienten folgen. Dabei zeigen hohe Werte präzise Chemotaxis, während niedrige Werte auf Chemokinese hindeuten. Auch ist der *CPI* unabhängig vom verwendeten Assay, solange die Daten die Berechnung des Index zulassen, d.h. es werden zeitaufgelöste Zelltrajektorien und die Richtung des Gradienten benötigt. Trotz dieser Vorteile hat auch der *CPI* seine Grenzen, und zwar im Fall von schwacher Chemotaxis bzw. kurzen Trajektorien. In diesem Fall sind die erhaltenen Daten nicht aussagekräftig und es sollte ein alternativer Chemotaxisassay verwendet werden. Der eingeführte Chemotaxisindex *CPI* ist für die Quantifizierung der Migration von Zellen in Lösung oder auf Oberflächen, also Chemotaxis und Haptotaxis, geeignet und kann die Präzision, mit der die Zellmigration entlang eines Gradienten stattfindet, deutlich besser angeben, als die in der Literatur verwendeten Indices.

Abschließend wurden die Migrationsgeschwindigkeiten analysiert. Dabei wurden die Geschwindigkeiten während der ersten, zweiten und dritten Stunde des Experiments sowie die mittlere Ge-

---

schwindigkeit bestimmt. Dabei ergaben sich ähnliche Geschwindigkeitsverteilungen für Neutrophile wie in der Literatur von z.B. Frevert *et al.* beschrieben, dessen Bereich ebenfalls bis  $10\mu\text{m min}^{-1}$  umfasste.<sup>[293]</sup> Auch die mittleren Geschwindigkeiten mit Werten zwischen 3 und  $4\mu\text{m min}^{-1}$  stimmten mit der Literatur überein, wo Werte von  $2,5\mu\text{m min}^{-1}$ <sup>[293]</sup> und Geschwindigkeiten zwischen 2 und  $10\mu\text{m min}^{-1}$  abhängig von der Steigung des Gradienten und der IL-8 Menge<sup>[123,176,256,289]</sup> angegeben werden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Migrationsgeschwindigkeit und der Zeit während des Experiments beobachtet werden. Die durchschnittlichen Geschwindigkeiten unterschieden sich kaum in den einzelnen Stunden, sodass die von der Oberfläche diffundierende IL-8 Menge keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen zu haben scheint. Die Vermutung der Ausbildung eines zusätzlichen, löslichen IL-8 Gradienten direkt oberhalb der Oberfläche konnte damit bestärkt werden.

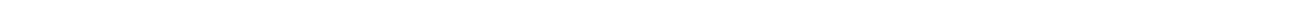
Der in dieser Arbeit entwickelte Haptotaxisassay bildet eine sehr einfache Grundlage, um die Haptotaxis von Zellen in Antwort auf einen oberflächengebundenen Chemokingradienten zu untersuchen. Der Transfer von Diffusionsgradienten in Agarosegelen auf eine Petrischalenoberfläche ist vermutlich auch auf weitere Chemokine und andere Proteine übertragbar. Durch die zeitaufgelöste Mikroskopie können Informationen auf dem Einzelzelllevel für eine große Anzahl an Zellen generiert werden, aus denen statistische Daten über diese Zellpopulation erhalten werden können. Dabei werden nur kleine Mengen an Protein, Zellen und anderen Reagenzien benötigt. Der Assay ist somit sehr einfach und kostengünstig durchzuführen. Dabei können Zusammenhänge zwischen dem migratorischen Verhalten von Zellen und der Gradientenform, steuerbar durch verschiedene Diffusionsbedingungen, Proteinkonzentrationen oder Oberflächenmodifikationen, untersucht werden. Das hier verwendete Modellsystem der Neutrophilen, die auf einen IL-8 Gradienten reagieren, ist nur ein Beispiel aus dem großen Feld der Chemokine, die die Migration von Immunzellen und weiteren Zelltypen auslösen. Chemokine sind auch nicht die einzigen Chemoattraktanten, die eine Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen spielen. So kann die Funktion von weiteren Chemoattraktanten wie des Komplementfaktors 5a<sup>[294]</sup>, inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktoren (TNF)<sup>[295]</sup>, Wachstumsfaktoren wie CSF-1<sup>[294]</sup> oder modulierenden Faktoren wie Adhäsionsmolekülen, z.B. Selektinen<sup>[296]</sup> und Integrinen<sup>[291]</sup>, untersucht werden. Auch können Inhibitoren der verwendeten Chemoattraktanten getestet werden. Zusätzlich kann der Einfluss löslicher Gradienten auf Zellen, die einem oberflächengebundenen Gradienten folgen, untersucht werden.<sup>[188,259,297]</sup> Die Kombination der Mikrofluidik mit der Immobilisierung von Proteinen sollte Gegenstand weiterer Arbeiten sein. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode werden Proteingradienten nicht-kovalent auf einer Oberfläche immobilisiert, sodass keine Modifikationen des Proteins notwendig sind. Dadurch können sowohl rekombinant hergestellte Proteine als auch native Proteine, aus Geweben oder Flüssigkeiten isoliert, verwendet werden. Ein weiterer interessanter Aspekt des Assays ist die Möglichkeit, oberflächengebundene Proteingradienten in Verbindung mit löslichen Substanzen zu untersuchen.

---

## 6.4 Fazit

---

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Assays zur Untersuchung der Chemotaxis von Leukozyten etabliert und neu entwickelt. Nach Untersuchungen der strukturellen und funktionellen Eigenschaften des verwendeten Chemokins IL-8 und seiner Derivate wurde dieses zur Induktion der Chemotaxis in neutrophilen Granulozyten eingesetzt. Für die Charakterisierung von Chemokininhibitoren lieferte der Transwellassay semi-quantitative Ergebnisse, während der klassische Aktinpolymerisationsassay sich als schlecht reproduzierbar herausstellte. Nachdem beide als nicht HTS-tauglich eingestuft werden konnten, wurde ein Aktinpolymerisationsassay in lebenden Zellen entwickelt, der mit einem Z'-Faktor von 0,5 und einer einfachen Durchführung zum *High-Throughput Screening* potentieller Chemokininhibitoren geeignet ist und bereits in einem neuen Projekt weitergeführt wird. Als Methode zur Untersuchung der Chemotaxis auf Einzelzelebene wurde neben der Optimierung der weitverbreiteten Methode der Mikrofluidik zur Gradientenerzeugung ein diffusionsbasierter Haptotaxisassay entwickelt. Dieser liefert die Grundlage zur Untersuchung des haptotaktischen Verhaltens einer Zellpopulation auf Einzelzelebene und kann durch Immobilisierung verschiedener anderer Proteine, z.B. Adhäsionsmoleküle, das Verständnis der Regulation der Haptotaxis voranbringen. Zur Evaluation der mithilfe des Haptotaxisassays erhaltenen Daten wurde ein Index, der *Chemotactic Precision Index*, ausgearbeitet, der nun die einfache und intuitive Bewertung der Präzision, mit der Zellen entlang eines gegebenen Gradienten migrieren, erlaubt und die Beurteilung zukünftiger Studien zur gerichteten Migration erleichtern wird.





---

# Literaturverzeichnis

- [1] B. Moser, K. Willmann, *Ann. Rheum. Dis.* **2004**, 63, ii84-ii89.
- [2] B. Moser, M. Wolf *et al.*, *Trends Immunol.* **2004**, 25, 75-84.
- [3] I. Comerford, S. R. McColl, *Immunol. Cell Biol.* **2011**, 89, 183-184.
- [4] A. Zlotnik, O. Yoshie, *Immunity* **2012**, 36, 705-716.
- [5] J. W. Griffith, C. L. Sokol, A. D. Luster, *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, 32, 659-702.
- [6] M. Majka, A. Janowska, Wieczorek *et al.*, *Blood* **2001**, 97, 3075-3085.
- [7] Z. Brown, M. E. Gerritsen *et al.*, *Am. J. Pathol.* **1994**, 145, 913-921.
- [8] A. Stadnyk, *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2002**, 16, 241 - 246.
- [9] J. Henningsen, B. K. Pedersen, I. Kratchmarova, *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 311-321.
- [10] S. J. Allen, S. E. Crown, T. M. Handel, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25, 787-820.
- [11] E. J. Fernandez, E. Lolis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 42, 469-499.
- [12] Z. Johnson, A. Proudfoot, T. Handel, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, 16, 625-636.
- [13] P. M. Murphy, M. Baggiolini *et al.*, *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52, 145-176.
- [14] T. S. Olson, K. Ley, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, 283, R7-R28.
- [15] S. Thiele, M. Marie, Rosenkilde, *Curr. Med. Chem.* **2014**, 21, 3594-3614.
- [16] T. A. Springer, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 827-872.
- [17] E. F. Foxman, J. J. Campbell, E. C. Butcher, *J. Cell Biol.* **1997**, 139, 1349-1360.
- [18] F. Bachelier, A. Ben, Baruch *et al.*, *Pharmacol. Rev.* **2014**, 66, 1-79.
- [19] R. M. Strieter, P. J. Polverini *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 27348-27357.
- [20] A. Zlotnik, O. Yoshie, H. Nomiyama, *Genome biology* **2006**, 7, 243.
- [21] C. Gerard, B. J. Rollins, *Nat. Immunol.* **2001**, 2, 108-115.
- [22] N. Godessart, S. L. Kunkel, *Curr. Opin. Immunol.* **2001**, 13, 670-675.
- [23] D. Raman, T. Sobolik, Delmaire, A. Richmond, *Exp. Cell Res.* **2011**, 317, 575-589.
- [24] M. D. Turner, B. Nedjai *et al.*, *BBA Mol. Cell Res.* **2014**, 1843, 2563-2582.

- 
- [25] C. McManus, J. W. Berman *et al.*, *J. Neuroimmunol.* **1998**, 86, 20-29.
- [26] S. M. Cardona, J. A. Garcia, A. E. Cardona, *Chemokines* **2013**, 1-16.
- [27] S. A. Sarkar, C. E. Lee *et al.*, *Diabetes* **2012**, 61, 436-446.
- [28] M. Xia, B. T. Hyman, *J. Neurovirol.* **1999**, 5, 32-41.
- [29] C. Weber, A. Schober, A. Zerneck, *Arterioscl. Throm. Vas.* **2004**, 24, 1997-2008.
- [30] I. F. Charo, M. B. Taubman, *Circ. Res.* **2004**, 95, 858-866.
- [31] F. Balkwill, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 540-550.
- [32] F. Marra, F. Tacke, *Gastroenterology* **2014**, 147, 577-594.
- [33] H. J. Anders, V. Vielhauer, D. Schlöndorff, *Kidney Int.* **2003**, 63, 401-415.
- [34] D. Schloendorff, P. J. Nelson *et al.*, *Kidney Int.* **1997**, 51, 610-621.
- [35] S. Segerer, P. J. Nelson, D. Schlöndorff, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, 11, 152-176.
- [36] R. E. Smith, R. Strieter *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **1995**, 57, 782-787.
- [37] R. P. MacDermott, I. R. Sanderson, H. C. Reinecker, *Inflamm. Bowel Dis.* **1998**, 4, 54-67.
- [38] T. Yoshimura, K. Matsushima *et al.*, *Pharmacol. Rev.* **1987**, 84, 9233-9237.
- [39] A. Mortier, N. Berghmans *et al.*, *PloS One* **2011**, 6, 23913.
- [40] M. Baggiolini, I. Clark, Lewis, *FEBS Lett.* **1992**, 307, 97-101.
- [41] G. M. Clore, E. Appella *et al.*, *Biochemistry* **1990**, 29, 1689-1696.
- [42] E. T. Baldwin, I. T. Weber *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 502-506.
- [43] S. D. Burrows, M. L. Doyle *et al.*, *Biochemistry* **1994**, 33, 12741-12745.
- [44] B. Goger, Y. Halden *et al.*, *Biochemistry* **2002**, 41, 1640-1646.
- [45] W. Schnitzel, U. Monschein, J. Besemer, *J. Leukoc. Biol.* **1994**, 55, 763-770.
- [46] M. W. Nasser, S. K. Raghuwanshi *et al.*, *J. Immunol.* **2009**, 183, 3425-3432.
- [47] W. E. Holmes, J. Lee *et al.*, *Science* **1991**, 253, 1278-1280.
- [48] P. M. Murphy, H. L. Tiffany, *Science* **1991**, 253, 1280-1283.
- [49] M. W. Nasser, S. K. Raghuwanshi *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 6906-6915.
- [50] A. Samanta, J. J. Oppenheim, K. Matsushima, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 183-189.
- [51] J. Lee, R. Horuk *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16283-16287.
- [52] L. M. Campbell, P. J. Maxwell, D. J. Waugh, *Pharmaceuticals* **2013**, 6, 929-959.

- 
- [53] A. Chuntharapai, J. Lee *et al.*, *J. Immunol.* **1994**, *153*, 5682-5688.
- [54] J. Bernhagen, R. Krohn *et al.*, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 587-596.
- [55] A. Chuntharapai, K. J. Kim, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 2587-2594.
- [56] R. M. Richardson, B. C. Pridgen *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23830-23836.
- [57] H. U. Zeilhofer, W. Schorr, *Curr. Opin. Hematol.* **2000**, *7*, 178-182.
- [58] S. A. Jones, M. Wolf *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 6682-6686.
- [59] S. A. Jones, B. Dewald *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16166-16169.
- [60] D. J. Waugh, C. Wilson, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735-6741.
- [61] R. Stillie, S. M. Farooq *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86*, 529-543.
- [62] X. Wu, D. Kim *et al.*, *Analyst* **2014**, *139*, 4056-4063.
- [63] J. Wu, L. Ouyang *et al.*, *Biomed. Microdevices* **2014**, 1-8.
- [64] M. Baggiolini, A. Walz, S. L. Kunkel, *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 1045-1049.
- [65] P. A. Detmers, S. Lo *et al.*, *J. Exp. Med.* **1990**, *171*, 1155-1162.
- [66] F. M. Brennan, C. O. Zachariae *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 2141-2144.
- [67] M. C. Kraan, D. D. Patel *et al.*, *Arthritis Res.* **2001**, *3*, 65-71.
- [68] A. Strassburg, D. Droemann *et al.*, *Eur. Respir. J.* **2004**, *24*, 772-778.
- [69] B. T. Lund, N. Ashikian *et al.*, *J. Neuroimmunol.* **2004**, *155*, 161-171.
- [70] K. Gijssbers, G. Van, Assche *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1992-2000.
- [71] S. Apostolakis, K. Vogiatzi *et al.*, *Cardiovasc. Res.* **2009**, *84*, 353-360.
- [72] J. K. Singh, B. M. Simões *et al.*, *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, 210.
- [73] A. Shahzad, M. Knapp *et al.*, *Int. Arch. Med.* **2010**, *3*, 11.
- [74] T. M. Handel, Z. Johnson *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 385-410.
- [75] S. Massena, G. Christoffersson *et al.*, *Blood* **2010**, *116*, 1924-1931.
- [76] J. Middleton, A. M. Patterson *et al.*, *Blood* **2002**, *100*, 3853-3860.
- [77] A. E. Proudfoot, T. M. Handel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 1885-1890.
- [78] A. J. Hoogewerf, G. S. Kuschert *et al.*, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13570-13578.
- [79] A. Rot, *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 303 - 306.
- [80] J. Middleton, S. Neil *et al.*, *Cell* **1997**, *91*, 385-395.

- 
- [81] C. Salanga, T. Handel, *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 590-601.
- [82] R. V. Iozzo, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 609-652.
- [83] L. Kjellen, U. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443-475.
- [84] D. J. Hamel, A. E. Proudfoot, T. M. Handel, *Methods Enzymol.* **2009**, *461*, 71-102.
- [85] A. D. Lander, S. B. Selleck, *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 227-232.
- [86] A. E. Proudfoot, S. Fritchley *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10620-10626.
- [87] L. Chakravarty, L. Rogers *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29641-29647.
- [88] E. K. Lau, C. D. Paavola *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22294-22305.
- [89] G. S. Kuschert, A. J. Hoogewerf *et al.*, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11193-11201.
- [90] D. P. Witt, A. D. Lander, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 394-400.
- [91] G. S. Kuschert, F. Coulin *et al.*, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12959-12968.
- [92] A. D. Cardin, H. Weintraub, *Arterioscl. Throm. Vas.* **1989**, *9*, 21-32.
- [93] L. Wagner, O. O. Yang *et al.*, *Nature* **1998**, *391*, 908-911.
- [94] S. H. Zigmond, *J. Cell Biol.* **1977**, *75*, 606-616.
- [95] P. N. Devreotes, S. H. Zigmond, *Annu. Rev. of Cell Biol.* **1988**, *4*, 649-686.
- [96] J. G. Wagner, R. A. Roth, *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 349-374.
- [97] M. B. Lawrence, T. A. Springer, *Cell* **1991**, *65*, 859-873.
- [98] U. H. Andrian, J. D. Chambers *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 7538-7542.
- [99] K. Konstantopoulos, L. V. McIntire, *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2661-2665.
- [100] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301-314.
- [101] K. Ley, C. Laudanna *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 678-689.
- [102] E. Kolaczkowska, P. Kubes, *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 159-175.
- [103] M. B. Lawrence, G. S. Kansas *et al.*, *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 717-727.
- [104] G. S. Kansas, *Blood* **1996**, *88*, 3259-3287.
- [105] R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 485-491.
- [106] R. Alón, D. A. Hammer, T. A. Springer, *Nature* **1995**, *374*, 539-542.
- [107] V. Ramachandran, M. Williams *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 13519-13524.
- [108] A. Burke-Gaffney, P. G. Hellewell, *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *119*, 1149-1158.

- 
- [109] R. Schleimer, B. Rutledge, *J. Immunol.* **1986**, *136*, 649-654.
- [110] C. D. Sadik, N. D. Kim, A. D. Luster, *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 452-460.
- [111] G. Constantin, M. Majeed *et al.*, *Immunity* **2000**, *13*, 759-769.
- [112] C. Laudanna, J. Y. Kim *et al.*, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 37-46.
- [113] M. Phillipson, B. Heit *et al.*, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2569-2575.
- [114] M. Phillipson, P. Kubes, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1381-1390.
- [115] S. A. Parsons, R. Sharma *et al.*, *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 436-446.
- [116] T. Betsuyaku, J. Michael, Shipley *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1999**, *20*, 1303-1309.
- [117] E. Kolaczkowska, W. Grzybek *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *85*, 374-381.
- [118] S. Wang, M. B. Voisin *et al.*, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1519-1532.
- [119] D. Proebstl, M. B. Voisin *et al.*, *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1219-1234.
- [120] K. Stark, A. Eckart *et al.*, *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 41-51.
- [121] T. D. Pollard, G. G. Borisy, *Cell* **2003**, *112*, 453-465.
- [122] A. v. Philipsborn, M. Bastmeyer, *Int. Rev. Cytol.* **2007**, *263*, 1-62.
- [123] F. Lin, C. M. C. Nguyen *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2004**, *319*, 576-581.
- [124] I. M. Herman, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 48-55.
- [125] T. Oda, M. Iwasa *et al.*, *Nature* **2009**, *457*, 441-445.
- [126] W. Kabsch, J. Vandekerckhove, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 49-76.
- [127] R. Dominguez, K. C. Holmes, *Annu. Rev. Biophys.* **2011**, *40*, 169-186.
- [128] M. A. Conti, R. S. Adelstein, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 11-18.
- [129] J. Small, G. Isenberg, J. Celis, *Nature* **1978**, *272*, 638-639.
- [130] D. Drenckhahn, T. D. Pollard, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 12754-12758.
- [131] D. Pantaloni, C. Le, Clainche, M. F. Carlier, *Science* **2001**, *292*, 1502-1506.
- [132] C. Dos, Remedios, D. Chhabra *et al.*, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 433-473.
- [133] M. F. Carlier, D. Pantaloni *et al.*, *FEBS Lett.* **1988**, *235*, 211-214.
- [134] L. Blanchoin, T. D. Pollard, *Biochemistry* **2002**, *41*, 597-602.
- [135] M. Carlier, D. Pantaloni, *Biochemistry* **1986**, *25*, 7789-7792.
- [136] T. D. Pollard, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2747-2754.

- 
- [137] V. K. Vinson, E. M. De, La, Cruz *et al.*, *Biochemistry* **1998**, 37, 10871-10880.
- [138] D. A. Kaiser, V. K. Vinson *et al.*, *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 3779-3790.
- [139] D. Safer, V. T. Nachmias, *Bioessays* **1994**, 16, 473-479.
- [140] L. Blanchoin, T. D. Pollard, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 15538-15546.
- [141] C. Le, Clainche, M. F. Carlier, *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 489-513.
- [142] R. D. Mullins, J. A. Heuser, T. D. Pollard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 6181-6186.
- [143] D. A. Lauffenburger, A. F. Horwitz, *Cell* **1996**, 84, 359-369.
- [144] J. V. Small, T. Stradal *et al.*, *Trends Cell Biol.* **2002**, 12, 112-120.
- [145] P. Friedl, B. Weigelin, *Nat. Immunol.* **2008**, 9, 960-969.
- [146] A. Mogilner, G. Oster, *Biophys. J.* **1996**, 71, 3030-3045.
- [147] A. Y. Alexandrova, K. Arnold *et al.*, *PloS One* **2008**, 3, e3234-e3234.
- [148] M. Vicente, Manzanares, C. K. Choi, A. R. Horwitz, *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 199-206.
- [149] G. Bernardini, D. Ribatti *et al.*, *J. Immunol. Methods* **2003**, 273, 83-101.
- [150] R. M. Strieter, M. D. Burdick *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2005**, 16, 593-609.
- [151] E. C. Keeley, B. Mehrad, R. M. Strieter, *Arterioscl. Throm. Vas.* **2008**, 28, 1928-1936.
- [152] A. E. Koch, P. J. Polverini *et al.*, *Science* **1992**, 258, 1798-1798.
- [153] Z. Szekanecz, M. Shah *et al.*, *Pathobiology* **1994**, 62, 134-139.
- [154] T. Shono, M. Ono *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 4231-4239.
- [155] A. Li, S. Dubey *et al.*, *J. Immunol.* **2003**, 170, 3369-3376.
- [156] A. Li, M. L. Varney *et al.*, *Angiogenesis* **2005**, 8, 63-71.
- [157] R. Salcedo, J. H. Resau *et al.*, *FASEB J.* **2000**, 14, 2055-2064.
- [158] D. J. Brat, A. C. Bellail, E. G. Van, Meir, *Neuro. Oncol.* **2005**, 7, 122-133.
- [159] I. U. Schraufstatter, J. Chung, M. Burger, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2001**, 280, L1094-L1103.
- [160] F. Lynen, U. Wieland, *Liebigs Ann.* **1938**, 533, 93-117.
- [161] J. A. Cooper, *J. Cell Biol.* **1987**, 105, 1473-1478.
- [162] T. H. Howard, C. Oresajo, *Cell Motility* **1985**, 5, 545-557.
- [163] T. H. Howard, D. Wang, *J. Clin. Invest.* **1987**, 79, 1359-1364.

- 
- [164] J. Wehland, M. Osborn, K. Weber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, 74, 5613-5617.
- [165] J. Wehland, K. Weber, *Eur. J. Cell Biol.* **1981**, 24, 176-183.
- [166] M. Westphal, A. Jungbluth *et al.*, *Curr. Biol.* **1997**, 7, 176-183.
- [167] A. Choidas, A. Jungbluth *et al.*, *Eur. J. Cell Biol.* **1998**, 77, 81-90.
- [168] T. Bretschneider, S. Diez *et al.*, *Curr. Biol.* **2004**, 14, 1-10.
- [169] O. Collin, S. Na *et al.*, *Curr. Biol.* **2008**, 18, 1288-1294.
- [170] J. Hu, X. Bai *et al.*, *Curr. Biol.* **2012**, 22, 1109-1115.
- [171] K. M. Pang, E. Lee, D. A. Knecht, *Curr. Biol.* **1998**, 8, 405-408.
- [172] P. Lénárt, C. P. Bacher *et al.*, *Nature* **2005**, 436, 812-818.
- [173] S. Boyden, *J. Exp. Med.* **1962**, 115, 453-466.
- [174] R. D. Nelson, P. G. Quie, R. L. Simmons, *J. Immunol.* **1975**, 115, 1650-1656.
- [175] D. Zicha, G. A. Dunn, A. F. Brown, *J. Cell Sci.* **1991**, 99, 769-775.
- [176] N. Li, Jeon, H. Baskaran *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 826-830.
- [177] G. M. Whitesides, *Nature* **2006**, 442, 368-373.
- [178] N. L. Jeon, S. K. Dertinger *et al.*, *Langmuir* **2000**, 16, 8311-8316.
- [179] T. Das, S. Chakraborty, *Springer* **2010**, ISBN 978-1-4419-1543-6.
- [180] P. Tabeling, *Oxford University Press* **2010**, ISBN 0199588163.
- [181] D. Chakraborty, S. Chakraborty, *Springer* **2010**, ISBN 978-1-4419-1543-6.
- [182] T. M. Squires, S. R. Quake, *Rev. Mod. Phys.* **2005**, 77, 977-1026.
- [183] F. Lin, E. C. Butcher, *Lab Chip* **2006**, 6, 1462-1469.
- [184] S. K. Dertinger, D. T. Chiu *et al.*, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1240-1246.
- [185] G. M. Walker, J. Sai *et al.*, *Lab Chip* **2005**, 5, 611-618.
- [186] H. Lu, L. Y. Koo *et al.*, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5257-5264.
- [187] D. Irimia, S. Y. Liu *et al.*, *Lab Chip* **2006**, 6, 191-198.
- [188] F. Lin, C. M. C. Nguyen *et al.*, *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, 33, 475-482.
- [189] W. Saadi, S. J. Wang *et al.*, *Biomed Microdevices* **2006**, 8, 109-118.
- [190] W. Jung, J. Han *et al.*, *Microelectron. Eng.* **2015**, 132, 46-57.
- [191] P. Yager, T. Edwards *et al.*, *Nature* **2006**, 442, 412-418.

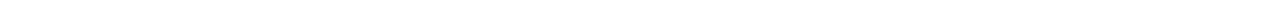
- 
- [192] X. Mao, T. J. Huang, *Lab Chip* **2012**, *12*, 1412-1416.
- [193] A. K. Yetisen, M. S. Akram, C. R. Lowe, *Lab Chip* **2013**, *13*, 2210-2251.
- [194] A. C. Philipsborn, S. Lang *et al.*, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1322-1328.
- [195] G. M. Hjortø, M. Hansen *et al.*, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5305-5311.
- [196] G. A. Dominguez, D. A. Hammer, *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 862-873.
- [197] J. C. Love, L. A. Estroff *et al.*, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1170.
- [198] E. Migliorini, D. Thakar *et al.*, *Biomaterials* **2014**, *35*, 8903-8915.
- [199] A. C. Philipsborn, S. Lang *et al.*, *Sci. Signal.* **2007**, *2007*, pl6.
- [200] S. K. W. Dertinger, X. Jiang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12542-12547.
- [201] S. G. Ricoult, T. E. Kennedy, D. Juncker, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 1-12.
- [202] M. Mayer, J. Yang *et al.*, *Proteomics* **2004**, *4*, 2366-2376.
- [203] J. Mai, L. Fok *et al.*, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 7450-7458.
- [204] M. A. Holden, P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8074-8075.
- [205] J. M. Bélisle, J. P. Correia *et al.*, *Lab Chip* **2008**, *8*, 2164-2167.
- [206] J. M. Bélisle, D. Kunik, S. Costantino, *Lab Chip* **2009**, *9*, 3580-3585.
- [207] A. Waldbaur, B. Waterkotte *et al.*, *Small* **2012**, *8*, 1570-1578.
- [208] V. N. Vernekar, C. S. Wallace *et al.*, *Colloids Surf., B* **2014**, *123*, 225-235.
- [209] S. Tsuchiya, M. Yamabe *et al.*, *Int. J. Cancer* **1980**, *26*, 171-176.
- [210] F. Graham, J. Smiley *et al.*, *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59-72.
- [211] K. Bieback, M. Vinci *et al.*, *Cytotherapy* **2013**, *15*, 726-739.
- [212] D. Wiese, K. Schmitz, *J. Immunol. Methods* **2011**, *364*, 77-82.
- [213] H. Wiggins, J. Rappoport, *Biotechniques* **2010**, *48*, 120-123.
- [214] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671-675.
- [215] B. R. Moore, *Biometrika* **1980**, *67*, 175-180.
- [216] E. F. Foxman, E. J. Kunkel, E. C. Butcher, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 577-588.
- [217] I. Rink, J. Rink *et al.*, *J. Immunol.* **2015**, *194*, 5549-5558.
- [218] D. Helmer, *Cuvillier Verlag* **2015**, ISBN 978-3-95404-984-4.
- [219] P. Smith, R. I. Krohn *et al.*, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.



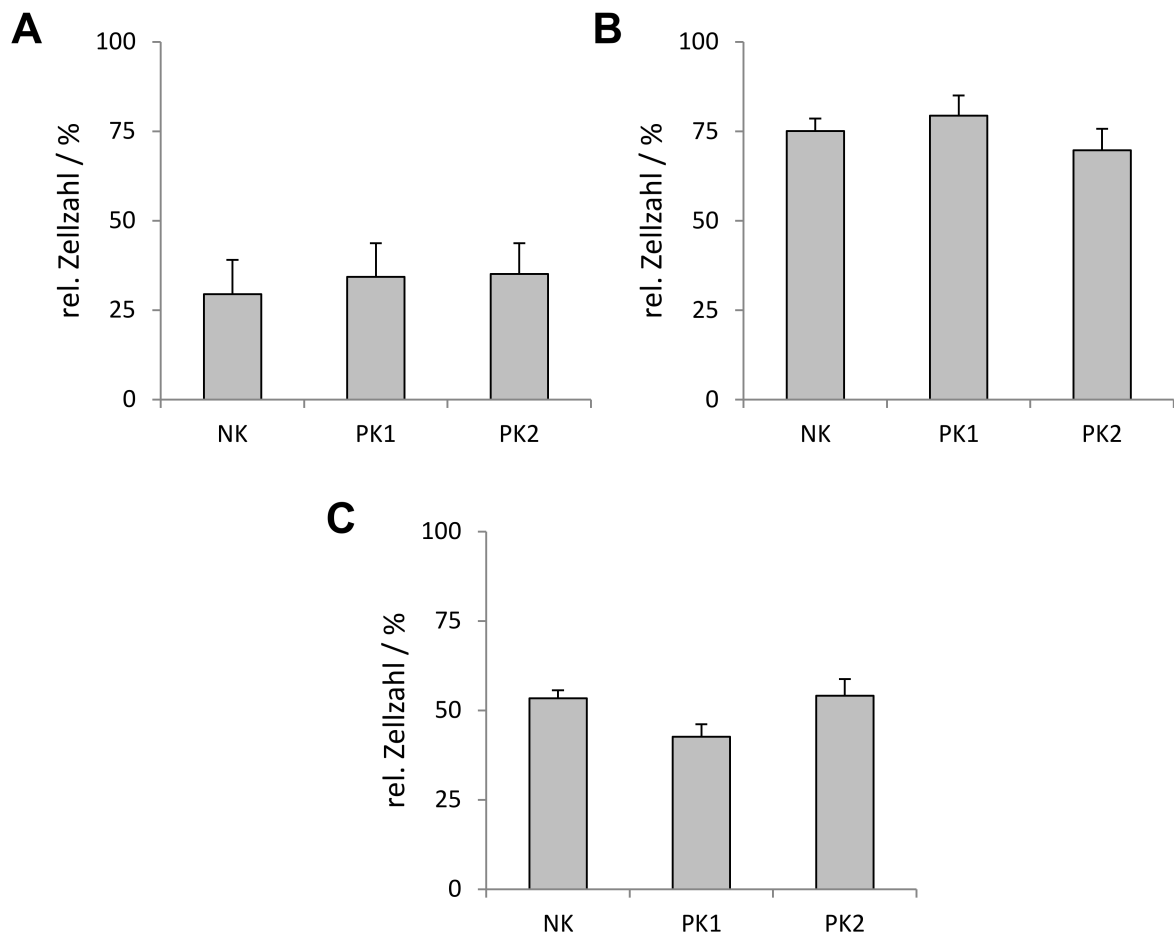
- 
- [220] A. Sivashanmugam, V. Murray *et al.*, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 936-948.
- [221] H. T. Cheng, K. C. Huang *et al.*, *Protein Expr. Purif.* **2008**, *61*, 65-72.
- [222] R. Gallagher, S. Collins *et al.*, *Blood* **1979**, *54*, 713-733.
- [223] T. Breitman, S. E. Selonick, S. J. Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 2936-2940.
- [224] A. B. Hauert, S. Martinelli *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 838-854.
- [225] A. Hirayama, R. Adachi *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 720-728.
- [226] N. Montuori, K. Bifulco *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 2453-2467.
- [227] M. J. Kim, S. Pal *et al.*, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *593*, 214-223.
- [228] R. Twigg, *Nature* **1945**, *155*, 401-402.
- [229] J. O'Brien, I. Wilson *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
- [230] D. Helmer, I. Rink *et al.*, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 25657-25668.
- [231] E. Schiffmann, B. A. Corcoran, S. M. Wahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 1059-1062.
- [232] H. Showell, R. J. Freer *et al.*, *J. Exp. Med.* **1976**, *143*, 1154-1169.
- [233] S. W. Fesik, R. Gampe, Jr *et al.*, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6574-6583.
- [234] N. J. Skelton, C. Quan *et al.*, *Structure* **1999**, *7*, 157-168.
- [235] J. Song, L. K. Durrin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 14373-14378.
- [236] J. S. Saad, J. Miller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 11364-11369.
- [237] K. Takeuchi, G. Wagner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 109-117.
- [238] B. L. Grasberger, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 364-372.
- [239] D. L. Taylor, Y. L. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 857-861.
- [240] L. S. Barak, R. R. Yocum, W. W. Webb, *J. Cell Biol.* **1981**, *89*, 368-372.
- [241] J. Anderl, H. Echner, H. Faulstich, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2072-2084.
- [242] L. S. Barak, R. R. Yocum *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, *77*, 980-984.
- [243] A. Bangham, R. Horne *et al.*, *Nature* **1963**, 952-5.
- [244] J. A. Johnson, M. O. Gray *et al.*, *Circ. Res.* **1996**, *79*, 1086-1099.
- [245] B. S. Negrutskii, R. Stapulionis, M. P. Deutscher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 964-968.
- [246] A. Hudder, L. Nathanson, M. P. Deutscher, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 9318-9326.
- [247] K. Medepalli, B. W. Alphenaar *et al.*, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 205101.

- 
- [248] K. Biber, M. W. Zuurman *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **2003**, 74, 243-251.
- [249] M. Dagan, Berger, R. Feniger, Barish *et al.*, *Blood* **2006**, 107, 3821-3831.
- [250] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screen.* **1999**, 4, 67-73.
- [251] M. Gurrbach, *Mensch und Buch Verlag* **2013**, ISBN 3863873289.
- [252] P. Grob, E. David *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 8311-8316.
- [253] S. J. Roth, M. W. Carr, T. A. Springer, *Eur. J. Immunol.* **1995**, 25, 3482-3488.
- [254] D. D. Taub, *Cytokine Growth Factor Rev.* **1996**, 7, 355-376.
- [255] N. Agrawal, M. Toner, D. Irimia, *Lab Chip* **2008**, 8, 2054-2061.
- [256] W. G. Tharp, R. Yadav *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **2006**, 79, 539-554.
- [257] L. Chen, C. Janetopoulos *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **2003**, 14, 5028-5037.
- [258] E. Sapey, H. Greenwood *et al.*, *Blood* **2014**, 123, 239-248.
- [259] M. B. Byrne, Y. Kimura *et al.*, *PloS One* **2014**, 9, e85726.
- [260] E. K. H. Sackmann, E. Berthier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, 111, 5813-5818.
- [261] E. F. Keller, L. A. Segel, *J. Theor. Biol.* **1971**, 30, 225-234.
- [262] R. David, Z. Machova, A. G. Beck, Sickinger, *Biol. Chem.* **2003**, 384, 1619-1630.
- [263] J. Inglese, P. Samama *et al.*, *Biochemistry* **1998**, 37, 2372-2377.
- [264] J. Marley, M. Lu, C. Bracken, *J. Biomol. NMR* **2001**, 20, 71-75.
- [265] A. Ravindran, P. R. B. Joseph, K. Rajarathnam, *Biochemistry* **2009**, 48, 8795-8805.
- [266] R. S. Schmid, B. R. Midkiff *et al.*, *Neuroreport* **2004**, 15, 2791-2794.
- [267] J. Roland, B. J. Murphy *et al.*, *Blood* **2003**, 101, 399-406.
- [268] A. Zaslaver, R. Feniger, Barish, A. Ben, Baruch, *J. Immunol.* **2001**, 166, 1272-1284.
- [269] M. Matloubian, A. David *et al.*, *Nat. Immunol.* **2000**, 1, 298-304.
- [270] N. Zhang, S. Inan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 4536-4541.
- [271] S. Singh, S. Wu *et al.*, *Microvasc. Res.* **2011**, 82, 318-325.
- [272] J. Heidemann, H. Ogawa *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 8508-8515.
- [273] I. U. Schraufstatter, K. Trieu *et al.*, *J. Immunol.* **2003**, 171, 6714-6722.
- [274] P. Schratzberger, C. Kähler, C. Wiedermann, *Ann. Hematol.* **1996**, 72, 23-27.
- [275] D. Bittleman, R. Erger, T. Casale, *Inflamm. Res.* **1996**, 45, 89-95.

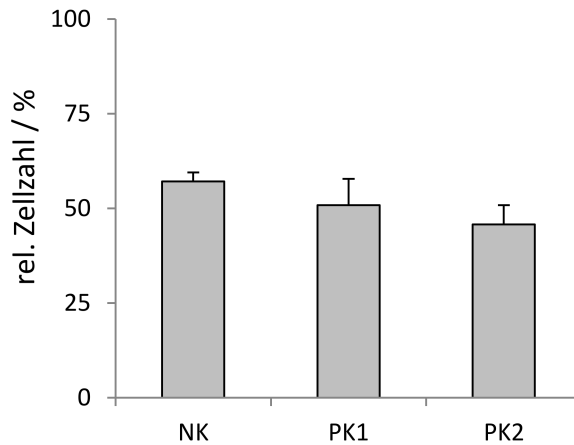
- 
- [276] S. Kawa, S. Kimura *et al.*, *FEBS Lett.* **1997**, 420, 196-200.
- [277] N. Kanayama, Y. Kajiwara *et al.*, *J. Leukoc. Biol.* **1995**, 57, 129-134.
- [278] Y. L. Zu, J. Qi *et al.*, *The Journal of Immunology* **1998**, 160, 1982-1989.
- [279] A. N. Hoang, C. N. Jones *et al.*, *Technology* **2013**, 1, 49-57.
- [280] P. A. Detmers, D. E. Powell *et al.*, *J. Immunol.* **1991**, 147, 4211-4217.
- [281] W. F. Westlin, J. M. Kiely, M. Gimbrone, *J. Leukoc. Biol.* **1992**, 52, 43-51.
- [282] R. L. Sham, P. D. Phatak *et al.*, *Blood* **1993**, 82, 2546-2551.
- [283] J. Norgauer, J. Krutmann *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **1994**, 102, 310-314.
- [284] M. R. Miller, J. J. Castellot, A. B. Pardee, *Exp. Cell Res.* **1979**, 120, 421-425.
- [285] I. Walev, S. C. Bhakdi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 3185-3190.
- [286] M. Baerns, A. Behr *et al.*, *John Wiley & Sons* **2013**, ISBN 3527330720.
- [287] A. Rot, *Immunol. Today* **1992**, 13, 291-294.
- [288] R. Snyderman, E. Goetzl, *Science* **1981**, 213, 830-837.
- [289] T. M. Keenan, C. W. Frevert *et al.*, *Lab Chip* **2010**, 10, 116-22.
- [290] T. M. Carlos, J. M. Harlan, *Blood* **1994**, 84, 2068-2101.
- [291] V. K. Lishko, V. P. Yakubenko, T. P. Ugarova, *Exp. Cell Res.* **2003**, 283, 116-126.
- [292] S. P. Palecek, J. C. Loftus *et al.*, *Nature* **1997**, 385, 537-540.
- [293] C. W. Frevert, G. Boggy *et al.*, *Lab Chip* **2006**, 6, 849-856.
- [294] S. E. Webb, J. W. Pollard, G. E. Jones, *J. Cell Sci.* **1996**, 109, 793-803.
- [295] J. Wang, S. Walter, A. Mantovani, *Immunology* **1990**, 71, 364-367.
- [296] H. Subramanian, J. J. Grailer *et al.*, *J. Immunol.* **2012**, 188, 3223-3236.
- [297] B. Heit, S. Tavener *et al.*, *J. Cell Biol.* **2002**, 159, 91-102.



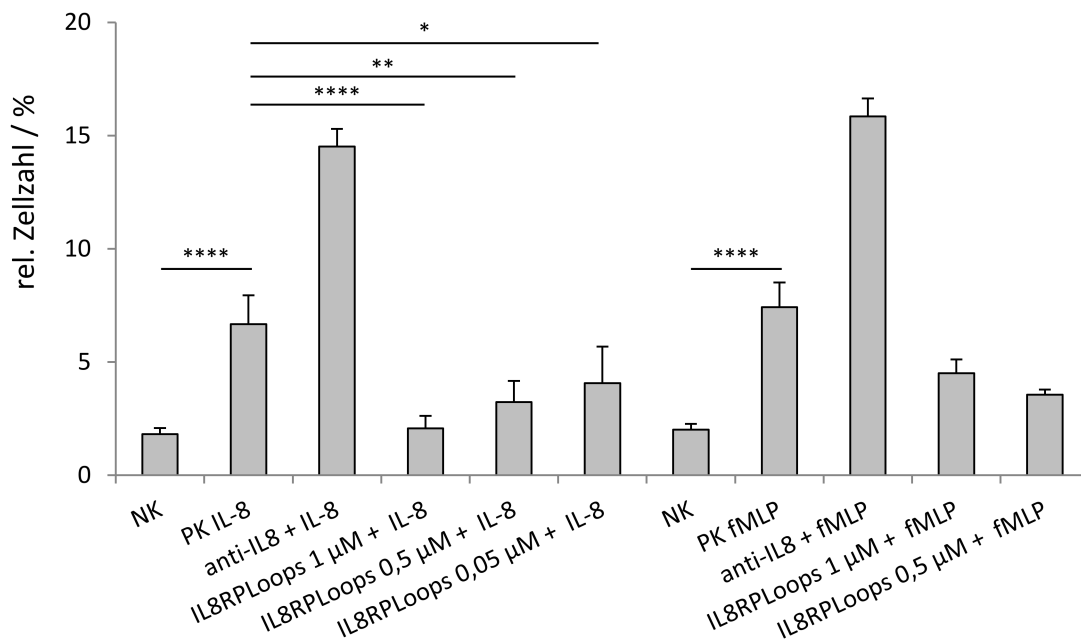
## 7 Anhang



**Abbildung 7.1:** Bestimmung des Migrationsverhaltens von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) in Antwort auf IL-8 im Transwellsystem in drei unabhängigen Versuchen A, B und C. Die Zahl der migrierten Zellen wurde analog zu den HEK293-Zellen über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. PK1 entspricht 10 und PK2 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).



**Abbildung 7.2:** Bestimmung des Migrationsverhaltens der *endothelial colony-forming cells* (ECFC) in Antwort auf IL-8 im Transwellssystem. Die Zahl der migrierten Zellen wurde analog zu den HEK293-Zellen über die Fluoreszenzintensität von Resorufin ( $\lambda_{\text{Ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 585 \text{ nm}$ ) nach 3 h Inkubationszeit bestimmt. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von migrierten Zellen zur Gesamtzellzahl. PK1 entspricht 10 und PK2 100  $\text{ng mL}^{-1}$  IL-8. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).



**Abbildung 7.3:** Transwellassay zur Inhibition der chemotaktischen Aktivität von IL-8 auf neutrophile Granulozyten mit IL8RPLoops. fMLP dient als Kontrolle zur spezifischen Wirkung des IL8RPLoops auf IL-8. PK entsprechen jeweils 0,1  $\mu\text{M}$  IL-8 bzw. fMLP. Diese IL-8 Konzentration wurde ebenfalls für die Antikörperkontrollen (anti-IL-8, 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) und die IL8RPLoops Inhibitionsversuche eingesetzt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen in der unteren Kammer des Transwellsystems in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).

---

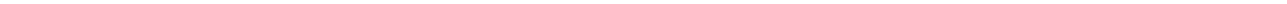
Ina Rink  
Taunusring 18  
64409 Messel

08. März 2016

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---





---

Ina Rink  
Taunusring 18  
64409 Messel

08. März 2016

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---